

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



La GTPasa endosomal RhoB regula la recuperación de la barrera endotelial durante la inflamación

BEATRIZ MARCOS RAMIRO

MADRID, 2015

MEMORIA PRESENTADA POR
BEATRIZ MARCOS RAMIRO,
LICENCIADA EN BIOLOGÍA,
PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN
BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA MOLECULAR, BIOMEDICINA
Y BIOTECNOLOGÍA

DIRECTOR DE LA TESIS:
Dr. JAIME MILLÁN MARTÍNEZ

Este trabajo ha sido realizado en el
Departamento de Biología Molecular.
Centro de Biología Molecular ‘Severo Ochoa’
(CSIC-UAM)

Este trabajo ha sido realizado en el Centro de Biología Molecular
Severo Ochoa (CSIC-UAM) bajo la dirección del doctor Jaime Millán
Martínez, Científico Titular del CSIC.

La realización de esta Tesis ha sido posible gracias a una beca
de Formación de Personal Investigador concedida a Beatriz Marcos Ramiro por el Ministerio de
Ciencia e Innovación.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	15
RESUMEN	23
INTRODUCCIÓN	29
1. <i>La respuesta inflamatoria</i>	32
1.1. Función de la respuesta inflamatoria en el organismo	32
1.2. El componente inflamatorio en las enfermedades humanas	33
1.3. Papel dinámico del endotelio durante la respuesta inflamatoria	34
1.4. Estímulos proinflamatorios, mediadores de la respuesta inflamatoria	35
1.4.1. TNF	36
1.4.2. Trombina	36
1.4.3. Relación bidireccional y efecto sinérgico entre el TNF y la trombina	38
2. <i>La familia de las Rho GTPasas</i>	38
2.1. Miembros de la familia de las Rho GTPasas	38
2.2. Ciclo de activación e inactivación de las Rho GTPasas	39
2.3. La subfamilia RhoA	40
2.3.1. Expresión	40
2.3.2. Modificaciones postraduccionales y localización	41
2.3.3. Reguladores y efectores	42
2.3.4. Funciones	43
2.4. Las Rho GTPasas son reguladores esenciales del citoesqueleto de actina	44
2.4.1. La vía de señalización Rho-ROCK y la generación de filamentos de actomiosina.	44
3. <i>Las Rho GTPasas en la remodelación de la monocapa endotelial durante la respuesta inflamatoria</i>	
3.1. Eventos que regulan el aumento de permeabilidad endotelial en respuesta a TNF	47
3.1.1. Remodelación del citoesqueleto de actina y las uniones intercelulares	48
3.1.2. Rac, las especies reactivas del oxígeno y permeabilidad endotelial	48
3.1.3. Rho GTPasas y la migración transendotelial de células de sistema inmunitario	50
3.1.4. Rho GTPasas y señalización por trombina	50
OBJETIVOS	53
MATERIALES Y MÉTODOS	57
1. <i>MATERIALES</i>	59
1.1. Anticuerpos	59
1.1.1. Anticuerpos primarios	59
1.1.2. Anticuerpos secundarios	61
1.2. Reactivos	62
1.3. Plásmidos	63

1.4.Oligonucleótidos	63
1.4.1. Oligonucleótidos	64
1.4.2. ARN de interferencia	64
2.MÉTODOS	65
2.1. Líneas celulares, cultivos primarios y condiciones de cultivo	65
2.2. Transfección de ADN y de ARN de interferencia	66
2.3. Ensayos de actividad de Rho-GTPasas por pull-down	66
2.4. Extracción de extractos proteicos celulares	67
2.5. Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE), electrotransferencia e inmunodetección (<i>Western-blot</i>)	67
2.6. Inmunofluorescencia y microscopía confocal	68
2.7. Microscopía confocal de alta resolución	69
2.8. Inmunohistoquímica	69
2.9. Ensayo de actividad PI3K	70
2.10. Ensayos de permeabilidad y trans migración	70
2.11. Ensayos de medición de la resistencia trans endotelial	71
2.12. Análisis estadístico	71
RESULTADOS	73
<i>1. RhoB humano se expresa en el endotelio de vasos sanguíneos en respuesta a la inflamación</i>	75
1.1. TNF e IL-1 β aumentan la expresión de RhoB en células endoteliales humanas	75
1.2. La expresión de RhoB está incrementada en el endotelio de muestras de tejidos de pacientes con enfermedad de Crohn y en los sinusoides hepáticos	77
1.3. TNF regula la transcripción del gen de RhoB por la ruta de señalización NF- κ B	79
1.4. RhoA, RhoB y RhoC se expresan en la misma proporción en células HUVECs estimuladas con TNF	81
1.5. RhoA, RhoB y RhoC se activan de forma similar en células HUVECs estimuladas con TNF	82
<i>2. La subfamilia RhoA presenta funciones aditivas y redundantes en el mantenimiento de la función de barrera</i>	82
2.1. Papel de RhoA, RhoB y RhoC en el mantenimiento de la función de barrera endotelial y en la regulación de la polimerización de actina en condiciones de reposo	83
2.2. Función de RhoA, RhoB y RhoC endotelial en la alteración de la función de barrera y la polimerización de actina en respuesta a TNF	85
2.3. El silenciamiento de RhoA, RhoB y RhoC no tiene efecto en la trans migración de leucocitos a través del endotelio	86
<i>3. RhoB regula específicamente la recuperación de la barrera endotelial tras una contracción protrombótica aguda</i>	87
3.1. Trombina activa a RhoA, RhoB y RhoC	87
3.2. RhoB, pero no RhoA y RhoC, regula la recuperación de la función de barrera tras la contracción inducida por trombina	88

4. <i>RhoB no regula específicamente la señalización que controla las fibras de estrés de actina</i>	90
4.1. RhoA, pero no RhoB, regula la fosforilación de la cadena ligera de la miosina II	90
4.2. RhoA y RhoB regulan conjuntamente la fosforilación de paxilina	91
5. <i>RhoB regula negativamente las extensiones de membrana plasmática durante la recuperación de la morfología celular tras la contracción</i>	92
5.1. RhoB constitutivamente activo no altera las uniones intercelulares	92
5.2. RhoB regula la extensión de las membranas endoteliales tras la contracción inducida por trombina	93
6. <i>Trombina modula el tráfico intracelular de RhoB</i>	94
6.1. Trombina estimula el tráfico intracelular de RhoB vesicular hacia y desde la membrana plasmática	94
6.2. RhoB cambia su distribución en respuesta a trombina	95
7. <i>RhoB regula la actividad y localización de Rac1</i>	98
7.1. RhoB y Rac1 colocalizan parcialmente en un compartimento positivo para Rab5	98
7.2. La sobreexpresión de un mutante constitutivamente activo o el silenciamiento de RhoB altera la localización subcelular de Rac1	100
7.3. El silenciamiento de RhoB altera la movilidad del compartimento endosomal de Rac1	100
7.4. RhoB regula la actividad de Rac1	101
7.5. La sobreexpresión de un mutante constitutivamente activo altera la capacidad de Rac1 para regular la expansión celular	102
7.6. El tráfico endosomal es esencial para la recuperación de la barrera endotelial	103
7.7. La alteración del tráfico y la actividad de Rac1 afectan a la recuperación de la barrera endotelial tras la contracción inducida por trombina	104
7.8. El efecto de RhoB sobre la restauración de la barrera endotelial es dependiente de Rac	105
7.9. Efecto diferencial de RhoB y Rac1 en la recuperación de la función de barrera en células en reposo o inflamadas con TNF	106
8. <i>RhoB regula la activación y localización de Akt durante la contracción aguda endotelial</i>	107
8.1. RhoB regula la fosforilación de Akt en respuesta a trombina en los residuos que determinan su activación	107
8.2. Akt regula la expansión de la célula endotelial sobre el sustrato	108
8.3. El efecto de RhoB sobre la restauración de la barrera endotelial es dependiente de la actividad de Akt	109
8.4. Rac1 y Akt1 no se regulan mutuamente durante la extensión de las membranas endoteliales	110
8.5. RhoB no regula a la maquinaria molecular que controla la actividad de Akt	111
8.6. La sobreexpresión de RhoB cambia la localización subcelular de Akt	115

DISCUSIÓN	119
1. <i>RhoA, RhoB y RhoC en la regulación de la permeabilidad en respuesta a TNF</i>	121
1.1. RhoB, pero no RhoA o RhoC, aumenta su expresión en respuesta a TNF	121
1.2. Regulación conjunta de la señalización en respuesta a TNF	122
2. <i>Regulación específica de RhoB de la contracción endotelial protrombótica</i>	123
2.1. RhoB no regula la contracción inducida por trombina pero sí la recuperación de la función de barrera	123
2.2. Papel del lamelipodio en la recuperación de la función de barrera	124
2.3. La localización regula la función: RhoB dirige la formación del lamelipodio a través de Rac y Akt	126
3. <i>Efecto diferencial de RhoB en la recuperación de la función de barrera en condiciones no inflamadas frente a inflamadas</i>	129
CONCLUSIONES	131
BIBLIOGRAFÍA	137
ANEXO	161
<i>Endothelial membrane reorganization during leukocyte extravasation</i>	163
<i>TNF-induced endothelial barrier disruption: beyond actin and Rho</i>	185
<i>Microparticles in multiple sclerosis and clinically isolated syndrome: effect on endothelial barrier function</i>	201
<i>Endosomal RhoB controls endothelial barrier recovery by inhibiting Rac1 trafficking to the cell border</i>	217



ABREVIATURAS

- **AJ**: del inglés *adherens junctions*
- **APC**: del inglés *Activated protein C*
- **AMPc**: adenosín monofosfato cíclico
- **AP-1**: del inglés *activator protein 1*
- **Arp2/3**: del inglés *actin related protein 2/3 complex*
- **ATP**: adenosín trifosfato
- **BSA**: del inglés *bovine serum albumin*
- **Cdc42**: del inglés *Cell division cycle 42*
- **DMEM**: del inglés *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- **DNA**: del inglés *deoxyribonucleic acid*
- **DTT**: ditioneitol
- **EBM-2**: del inglés *Endothelial Basal Medium-2*
- **ECIS**: del inglés *Electric Cell Substrate Impedance Sensing*
- **EDTA**: del inglés *Ethylenediaminetetraacetic acid*
- **EGF**: del inglés *epidermal growth factor*
- **EGM-2** : del inglés *Endothelial Cell Growth Medium-2*
- **EGFR**: del inglés *epidermal growth factor receptor*
- **ERK**: del inglés *Extracellular-signal regulated kinases*
- **F-actin**: actina filamentosa
- **FA**: del inglés *Focal Adhesion*
- **FAK**: del inglés *Focal Adhesion Kinase*
- **FITC**: del inglés *Fluorescein Isothiocyanate*
- **FMNL3**: del inglés *Formin-Like Protein 3*
- **GAPs**: del inglés *GTPase-Activating Proteins*
- **GDIs**: del inglés *Guanosine nucleotide dissociation inhibitors*
- **GDP**: guanosín difosfato
- **GEFs**: del inglés *Guanine nucleotide exchange factors*

- **GFP:** del inglés *Green Fluorescent Protein*
- **GST:** del inglés *Glutathione S-Transferase*
- **GTP:** guanosín trifosfato
- **GTPasa:** guanosín trifosfatasa
- **HBMECs:** del inglés *Human Brain Microvascular Endothelial Cells*
- **HDMECs:** del inglés *Human Dermal Microvascular Endothelial Cells*
- **HEK293:** del inglés *Human Embryonic Kidney 293 cells*
- **HEPES:** ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacil-(1)] etanosulfónico
- **HGF:** del inglés *hepatic growth factor*
- **HRP:** del inglés *horseradish peroxidase*
- **HUVECs:** del inglés *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*
- **Hz:** hercio
- **ICAM-1:** del inglés *Intercellular adhesion molecule-1*
- **IFN:** interferón
- **IGF-1:** del inglés *Insulin-like growth factor-1*
- **I κ B α :** del inglés *inhibitor of nuclear factor kappa-B*
- **IKK:** del inglés *inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase*
- **IL-1 β :** interleuquina-1 β
- **IPTG:** isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
- **JAM:** del inglés *Junctional adhesion molecule*
- **JNK:** del inglés *c-Jun N-terminal kinases*
- **LIMKs:** del inglés *LIM domain kinases*
- **MAPK:** del inglés *Mitogen-Activated Protein Kinases*
- **MLC:** del inglés *myosin light chain*
- **MLCK:** del inglés *myosin light chain kinase*
- **NADPH:** nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
- **NF- κ B:** del inglés *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
- **Ohms:** ohmios

- **PAR-1:** del inglés *Protease-activated receptor 1*
- **PAK:** del inglés *p21-activated kinase*
- **PBLs:** del inglés *peripheral blood mononuclear cells*
- **PBS:** solución salina tamponada con fosfato
- **PDGF:** del inglés *platelet derived growth factor*
- **PKC-1:** del inglés *Phosphoinositide-dependent kinase-1*
- **PIP:** fosfatidil inositol
- **PIP2:** fosfatidil inositol bifosfato
- **PIP3:** fosfatidil inositol trifosfato
- **PIP3K:** del inglés *phosphatidylinositol 3-kinase*
- **PKC:** del inglés *Protein kinase C*
- **PKN/PRK:** del inglés *Protein kinase N/ Protein-Kinase C-Related Kinase*
- **PMSF:** del inglés *phenylmethylsulfonyl fluoride*
- **PRKs:** del inglés *Protein Kinase C-Related Kinases*
- **PVDF:** del inglés *Polyvinylidene fluoride*
- **RNA:** del inglés *ribonucleic acid*
- **mRNA:** del inglés *messenger ribonucleic acid*
- **ROCK:** del inglés *Rho kinase*
- **ROS:** del inglés *reactive oxygen species*
- **Rtk:** del inglés *rhotekin*
- **S1P:** del inglés *Sphingosine-1-phosphate*
- **SAPK:** del inglés *stress-activated protein kinases*
- **SDF-1:** del inglés *stromal cell-derived factor 1*
- **SDS:** del inglés *Sodium Dodecyl Sulphate*
- **SDS-PAGE:** del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
- **siRNA:** del inglés *small interfering RNA*
- **STED:** del inglés *Stimulated emission depletion microscopy*
- **STORM:** del inglés *Stochastic optical reconstruction microscopy*

- **T:** trombina
- **TBS:** del inglés *Tris-buffered saline*
- **TEER:** del inglés *transendothelial electric resistance*
- **TF:** del inglés *tissue factor*
- **TGF- β :** del inglés *transforming growth factor*
- **TLC:** del inglés *thin layer chromatography*
- **TNF:** del inglés *tumor necrosis factor*
- **TNFR:** del inglés *tumor necrosis factor receptor*
- **TRPC-1:** del inglés *transient receptor potential cation channel 1*
- **TRITC:** tetrametilrodamina
- **VCAM-1:** del inglés *Vascular cell adhesion molecule-1*
- **VEGF:** del inglés *vascular endothelial growth factor*
- **WAVE:** del inglés *WASP-family verprolin-homologous protein*



RESUMEN

El endotelio forma la capa más interna de los vasos sanguíneos y separa el torrente circulatorio de los tejidos subyacentes. Su integridad es un requisito para el correcto desarrollo y terminación de la respuesta inflamatoria. Sin embargo, durante el transcurso de ésta, la función de la monocapa endotelial se ve comprometida debido a la acción combinada de las citoquinas pro-inflamatorias y las células inmunes. La inflamación es un componente de la mayoría de patologías de más prevalencia en nuestra sociedad y la disfunción endotelial es la base para el desarrollo de enfermedades inflamatorias crónicas.

Con el objetivo de identificar nuevas proteínas claves en la respuesta inflamatoria humana, hemos descubierto que la GTPasa RhoB aumenta su expresión en respuesta a estímulos pro-inflamatorios y es expresada abundantemente en el endotelio de muestras de tejidos humanos de enfermedades inflamatorias crónicas. RhoB, junto con sus homólogos RhoA y RhoC, presentan funciones aditivas en el mantenimiento de la barrera endotelial, redundantes en la polimerización de actina en condiciones de reposo o inflamadas y no están implicadas en el aumento de permeabilidad a largo plazo inducido por TNF o en la transmigración del linfocito *in vitro*. Sin embargo, RhoB juega un papel específico y relevante en la restauración de la función de barrera tras la acción de agentes pro-coagulantes. RhoB favorece la disfunción endotelial al prevenir la expansión de la célula sobre el sustrato tras la contracción endotelial aguda. Durante la recuperación, detectamos un incremento en el tráfico de vesículas de RhoB hacia y desde protrusiones nacientes de la membrana plasmática y demostramos que RhoB controla el tráfico intracelular de miembros de la maquinaria proteica que regulan la formación de extensiones de membrana. RhoB co-localiza con Rac en vesículas intracelulares e inhibe su activación y el tráfico de esta GTPasa hacia la membrana plasmática. Así mismo, RhoB inhibe la actividad de la serina quinasa Akt y evidencias sugieren que también podría impedir su tráfico hacia la periferia celular. La inhibición directa tanto de Rac como de Akt retrasa la recuperación de la barrera, que además se ve severamente afectada por inhibidores globales del tráfico intracelular. En cambio, la inducción de la translocación de Rac a la membrana plasmática acelera la reformación de la monocapa.

En conclusión, nuestros resultados indican que la regulación específica del tráfico intracelular de Rac y Akt por parte de RhoB controla la integridad de la barrera endotelial durante la inflamación, actuando esta GTPasa como un promotor de la disfunción endotelial.

The endothelium forms a monolayer of cells that lines on the intimal surface of the blood vessels and physically separates the bloodstream from the underlying tissues. Preserving endothelial integrity is required for the correct termination of the inflammatory reactions. Inflammation is present in some of the most prevalent diseases in our society. Endothelial barrier function could be endangered due to the combined action of pro-inflammatory cytokines and leukocytes, which could lead to an uncontrolled and pathologic inflammatory response. Indeed, endothelial barrier dysfunction underlies chronic inflammatory diseases.

In searching for new proteins essential for the human endothelial inflammatory response, we have found that the endosomal Rho GTPase RhoB is upregulated in response to inflammatory cytokines and expressed in the endothelium of chronically inflamed tissues. RhoB, and the closely related RhoA and RhoC, play redundant roles in regulating F-actin levels and additive roles in the maintenance of barrier integrity in unstimulated HUVECs. None of the proteins had relevant roles in long-term barrier disruption in response to TNF or in leukocyte transmigration *in vitro*. However, RhoB specifically inhibits barrier restoration after acute cell contraction by preventing plasma membrane extension. During barrier restoration, a two-way RhoB trafficking between vesicles containing RhoB nanoclusters and nascent plasma membrane protrusions is induced. We show that RhoB regulates the intracellular trafficking of proteins that controls membrane spreading. We further show that RhoB colocalizes with Rac in Rab5-positive endosomes and negatively regulates Rac1 activity and trafficking to the plasma membrane during barrier recovery. Furthermore, inhibition of endosomal trafficking impairs, whereas induction of Rac translocation to the plasma membrane accelerates, barrier reformation. In addition, we show that RhoB controls Akt activation and we have evidences that RhoB could also regulate Akt trafficking towards plasma membrane during recovery.

In conclusion, RhoB-specific regulation of Rac and Akt intracellular trafficking controls endothelial barrier integrity during inflammation. RhoB upregulation exacerbates endothelial responses to stimuli inducing acute contraction.



INTRODUCCIÓN

Formado por tejidos blandos y rodeado de un microcosmos bacteriano, el organismo humano ha tenido que enfrentarse al daño y la infección a lo largo de toda su historia. La inflamación como proceso fácilmente observable macroscópicamente debió de llamar la atención de los hombres prehistóricos como una de las respuestas fundamentales del organismo frente a la herida. Papiros egipcios de unos 5000 años de antigüedad ya hacen referencia al calor y al enrojecimiento como un hecho asociado al estado de enfermedad (Libby 2012). El inicio de la investigación del proceso inflamatorio puede fijarse en torno al siglo I D.C. y puede atribuirse, como tantas otras cosas del mundo moderno, al Imperio Romano. La palabra inflamación proviene del latín *inflammare* (incendiarse), mientras que el enciclopedista romano Aulus Cornelius Celsus describió los cuatro signos cardinales del proceso inflamatorio, que aún hoy utilizamos para describir los síntomas de la inflamación: enrojecimiento, hinchazón, calor y dolor. A éstos Rudolph Virchow añadió en 1858 un quinto (función comprometida) (Majno, G. 1975), indicando que cualquier respuesta inflamatoria altera la función y la homeostasis celular.

La inflamación es un proceso de defensa del propio organismo contra lo ajeno, como señaló en 1893 el premio Nobel Elie Metchnikoff: “*el elemento esencial y primario en la inflamación típica consiste en una reacción de los fagocitos frente al agente infeccioso*” (Metchnikoff 1893). Sin embargo, un proceso inflamatorio desmedido en duración u objetivo daña gravemente los tejidos y aumenta el riesgo de eventos tromboembólicos, como ya apuntó Hieronymus Gaubius en el siglo XVIII (“*la inflamación aumenta la disposición a la coagulación*”) (Jarcho 1970), adelantándose al actual conocimiento de la relación bidireccional entre inflamación y coagulación. Tras más de dos siglos de estudio de la respuesta inflamatoria, la investigación de los mecanismos moleculares que median la respuesta inflamatoria es de tremendo interés para los científicos actuales, no solo para entender la respuesta inmunitaria, sino también porque en ellos está la clave para el tratamiento de enfermedades de componente inflamatorio tan prevalentes en nuestra sociedad como la aterosclerosis o la esclerosis múltiple.

1. La respuesta inflamatoria

1.1. Función de la respuesta inflamatoria en el organismo

La inflamación es la primera respuesta del sistema inmune frente a la entrada de microorganismos o el daño en un tejido. Su objetivo final es eliminar la infección, deshacerse de los *debris* celulares y reparar el tejido dañado. Se inicia cuando las células que componen el tejido sufren una lesión directa por acción del agente agresivo o un patógeno. Las células del sistema inmune residentes en el tejido como los mastocitos y los macrófagos residentes o células inmune liberadas desde el torrente sanguíneo en el tejido dañado reconocen una serie de patrones moleculares extraños al tejido y liberan mediadores de la inflamación que dan origen a los cuatro síntomas que han sido clásicamente característicos del proceso inflamatorio: enrojecimiento, hinchazón, calor y dolor. Entre éstos se encuentran la histamina, que actúa sobre los vasos sanguíneos e induce vasodilatación y aumento de la permeabilidad; las enzimas proteolíticas y prostaglandinas, que además de inducir vasodilatación y aumento de la permeabilidad, también estimulan las terminaciones nerviosas del dolor; la heparina y los factores quimiotácticos reclutan al resto de células del sistema inmune que se encuentran circulantes en sangre al foco inflamatorio y el factor activador de plaquetas activa a las plaquetas induciendo su agregación y la liberación por parte de éstas de factores que inician los procesos de coagulación, como la trombina, que además actúa como agente quimiotáctico e induce vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular. Los macrófagos residentes, sobre todo, liberan citoquinas inflamatorias como TNF o IL-1 β que modulan la permeabilidad y la expresión de receptores de superficie del endotelio que contribuyen a promover la extravasación de leucocitos desde el torrente sanguíneo de los vasos circundantes al foco inflamatorio.

En general, todos estos mediadores inflamatorios confluyen en la vasodilatación y el aumento de permeabilidad endotelial, ya que este es el evento clave que va a permitir la llegada y la extravasación de moléculas (inmunoglobulinas, factores del complemento, factores de la coagulación) y células (neutrófilos, monocitos, linfocitos y otras células del sistema inmune) que a través de los mecanismos inmunes específicos van a acabar con la infección a medio plazo. Mientras que los anticuerpos producidos por linfocitos B se unen a los antígenos microbianos y los hacen reconocibles para los monocitos y macrófagos que los eliminan por fagocitosis, los linfocitos T van a responder frente a microorganismos intracelulares y a eliminar las células infectadas por éstos. Cuando las causas de la agresión han sido eliminadas se inician los procesos de resolución y reparación. El primero va dirigido a finalizar la respuesta inflamatoria, regulando su magnitud y evitando su prolongación en el tiempo, mientras que en la segunda la proliferación de células epiteliales, endoteliales y fibroblastos restaura la arquitectura del tejido dañado (Medzhitov 2008).

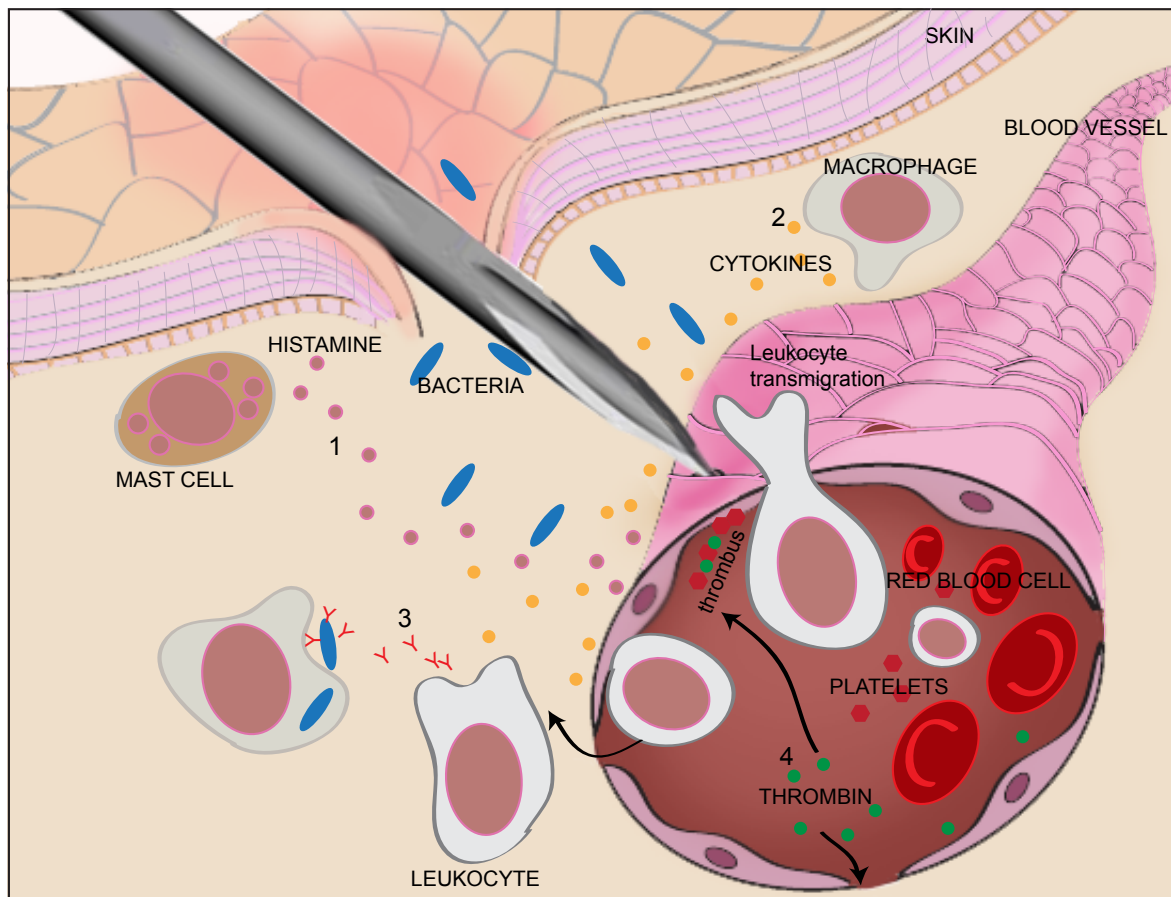


Ilustración 1. La respuesta inflamatoria humana. Cuando un tejido del organismo sufre un daño, las propias células dañadas activan a las células inmunes residentes en el tejido como los mastocitos y los macrófagos. En una primera fase, los mastocitos liberan histamina y otros mediadores de la inflamación que, por un lado activan y reclutan a las células del sistema inmune circulante y, además, inducen vasodilatación y aumento de la permeabilidad en los vasos sanguíneos circundantes (1). El mantenimiento de la respuesta inflamatoria requiere de la liberación de citoquinas pro-inflamatorias por parte de los macrófagos. Las citoquinas actúan sobre las células endoteliales e inducen cambios en la morfología y en la expresión proteica que aumentan la permeabilidad y facilitan la trans migración de los linfocitos activados (2). Una vez extravasados, los linfocitos utilizan diversos mecanismos para eliminar a los agentes patógenos (3). La liberación del agente de coagulación trombina media la agregación de las plaquetas y la formación de coágulos que taponan la herida, además de favorecer el aumento de permeabilidad del endotelio (4).

1.2. El componente inflamatorio en las enfermedades humanas

La respuesta inflamatoria exagerada en magnitud o que persiste en el tiempo es la base de muchas enfermedades humanas. La imposibilidad de eliminar el agente agresor o la aparición de autoantígenos da origen a un proceso de inflamación crónico que puede desencadenar una patología.

La aterosclerosis supone una de las principales causas de muerte en la sociedad industrializada. Se inicia con la acumulación de colesterol en la capa íntima de la arteria, situada entre el endotelio y el músculo liso. Las células endoteliales interpretan esta acumulación como una agresión e inician una respuesta inflamatoria que lleva a la acumulación de monocitos y tejido

fibroso, que forman la placa de ateroma. La ruptura de la placa de ateroma desencadena procesos de trombosis y oclusión arterial provocando enfermedades coronarias (Libby 2002).

La esclerosis múltiple es una enfermedad autoinmune que se inicia cuando células del sistema inmune, por factores desconocidos, son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica e iniciar una respuesta inmune al reconocer la mielina del sistema nervioso como antígeno. Se genera un proceso inflamatorio que se amplifica, estimula aún más el aumento de permeabilidad de la barrera hematoencefálica y se produce un daño constante a la mielina que finalmente lleva a la desmielinización y a la neurodegeneración (Compston y Coles 2008).

La enfermedad inflamatoria intestinal es una patología autoinmune con componente inflamatorio que se produce cuando bacterias de la población entérica del intestino se infiltran en el tejido subyacente, dando origen a una respuesta inflamatoria exagerada por parte del sistema inmune, lo que origina lesiones en la mucosa intestinal (colitis ulcerosa) o en toda la pared del intestino (enfermedad de Crohn) (Baumgart y Carding 2007). Los pacientes que sufren de estas patologías presentan daños severos del intestino con riesgo de sufrir eventos tromboembólicos (Scaldaferri et al. 2011; Suárez Ferrer et al. 2012).

La sepsis es consecuencia de una respuesta aberrante del sistema inmune a una infección grave y diseminada, potencialmente mortal ya que provoca disfunción microvascular y aumento de la actividad procoagulante pudiendo formarse coágulos de pequeño tamaño que interrumpen el flujo sanguíneo a órganos vitales (Jacobson y García 2007; Angus y van der Poll 2013).

La inflamación persistente contribuye así mismo a la aparición, progresión y empeoramiento de otras patologías humanas de gran incidencia, como las hepatopatías (Adams et al. 2010; Reglero-Real et al. 2014) o el cáncer (Grivennikov, Greten, y Karin 2010). Por todo ello, el estudio de los mecanismos moleculares que controlan la respuesta inflamatoria no sólo es interesante desde el punto de vista básico, sino que se convierte en muy relevante para las ciencias biomédicas.

1.3. Papel dinámico del endotelio durante la respuesta inflamatoria

El endotelio está constituido por la monocapa de células que recubre la parte más interna de los vasos sanguíneos y que está en contacto con el torrente circulatorio. Aunque ya en 1889 Julius Cohnheim realizó una descripción detallada de la cascada de adhesión leucocitaria y asumió que el cambio molecular del endotelio vascular debía sustentar este proceso (Cohnheim, J. 1889), históricamente la investigación del evento inflamatorio se centró en la caracterización de los linfocitos infiltrantes y su mecanismo de acción, considerándose al endotelio como una barrera pasiva que simplemente separaba el torrente sanguíneo del tejido subyacente. Más recientemente, la participación activa y reguladora de las células endoteliales en este proceso se ha hecho evidente y ha centrado el foco de estudio en ellas. Las células endoteliales presentan importantes funciones en el mantenimiento de la homeostasis vascular: mantienen la fluidez de la sangre, regulan el flujo sanguíneo, controlan el calibre del vaso y la permeabilidad de la pared vascular, mantienen un estado anti-coagulante...(Roth 1992; Fleming, Bauersachs, y Busse 1996; Coughlin 1999; Busse

y Fleming 2006; Arnout, Hoylaerts, y Lijnen 2006). Durante la respuesta inflamatoria, las células endoteliales se comportan como un elemento dinámico, que cambia su fenotipo para responder a las necesidades en cada estadio del proceso. En las primeras etapas, la interacción de los factores liberados por los mastocitos con receptores presentes en la superficie de las células endoteliales provoca cambios en la morfología de éstas, que se contraen dejando huecos en la monocapa, lo que aumenta la permeabilidad a factores solubles y células del sistema inmune. Sin embargo, los efectos vasodilatadores y de aumento de permeabilidad debidos a estos factores duran entre 10 y 20 minutos, por lo que una respuesta inflamatoria sostenida requiere de nuevos factores inflamatorios, generalmente citoquinas como el TNF y la interleuquina-1 (IL-1), que son producidos por los leucocitos activados y otras células del sistema inmune. Estas citoquinas inducen no sólo un aumento progresivo de la permeabilidad sino también la síntesis proteica: se sintetizan quimioquinas, que son liberadas para amplificar la respuesta inflamatoria y receptores de superficie, cuya función principal es reclutar los linfocitos a la superficie endotelial y guiarlos en su extravasación al tejido subyacente. Las citoquinas inflamatorias también señalizan al citoesqueleto de actina y a las uniones intercelulares, cooperando en el cambio morfológico de las células del endotelio y manteniendo el proceso inflamatorio (Pober y Sessa 2007).

Por otro lado, la adhesión y locomoción de los leucocitos sobre el endotelio induce también una señalización intracelular que desemboca en la reorganización de la superficie endotelial, del citoesqueleto de actina y de las uniones intercelulares, todo lo cual contribuye al aumento de permeabilidad y el mantenimiento del evento inflamatorio (Reglero-Real, Marcos-Ramiro, y Millán 2012). A tiempos más tardíos, el daño endotelial producido por los linfocitos activados, unido a la acción del TNF, la IL-1 y otros factores inflamatorios liberados en el proceso como el interferón (IFN) con capacidad proapoptótica, inducen la muerte celular en el endotelio. El daño y la muerte de células endoteliales favorecen la trombosis (Bombeli et al. 1997). La exposición del colágeno de la membrana basal subendotelial favorece la adhesión y agregación de plaquetas y el TNF y la IL-1 estimulan la síntesis del factor de coagulación, el principal iniciador de la cascada de coagulación, que culmina con la generación de trombina (Bevilacqua et al. 1986). La trombina induce la formación de fibrina que adhiere las plaquetas entre sí dando origen a la formación del trombo, el cual limita la circulación sanguínea para aislar el tejido infectado e impedir la dispersión del agente infeccioso.

1.4. Estímulos proinflamatorios, mediadores de la respuesta inflamatoria

Los estímulos proinflamatorios liberados por los distintos tipos celulares implicados en la inflamación son responsables de la remodelación del endotelio. Tras interaccionar con receptores de la superficie endotelial disparan la activación de cascadas de señalización intracelulares y cambios en los patrones de expresión génica y síntesis proteica. Algunos estímulos proinflamatorios inducen una respuesta inmediata sobre el endotelio, induciendo un aumento de la permeabilidad rápido y agudo. Es el caso de la histamina liberada por los mastocitos en las primeras etapas de la respuesta inflamatoria o de la trombina producida en respuesta al daño vascular. En cambio, otros estímulos proinflamatorios producen cambios a largo plazo sobre el endotelio, induciendo un aumento en la permeabilidad progresivo y sostenido, lo que mantiene y amplifica el evento inflamatorio asegurando la eliminación del agente patógeno y la reparación del daño tisular. Es el caso del TNF, la IL-1 o el IFN. De

entre los diversos estímulos proinflamatorios, el TNF y la trombina son paradigmáticos, pues han sido ampliamente empleados para estudiar la respuesta inflamatoria y, aunque sus efectos sobre el endotelio son bien conocidos, los eventos moleculares que los median no han sido completamente dilucidados.

1.4.1. TNF

El TNF (del inglés *tumor necrosis factor*) es uno de los mediadores inflamatorios más importantes de la respuesta inflamatoria, pues regula su iniciación, mantenimiento y resolución (Madge y Pober 2001). Esta citoquina es sintetizada como una proteína transmembrana fundamentalmente por macrófagos, células dendríticas y linfocitos activados (Bradley 2008). El TNF es procesado por proteasas específicas, liberando su dominio extracelular como un homotrímero soluble (Black et al. 1997). El TNF soluble se une a dos tipos de receptores que se expresan ubicuamente (TNFR1) o sólo en células inmunes y endoteliales (TNFR2). La unión del TNF al receptor en la superficie de células endoteliales provoca la activación de éste, que recluta en su dominio intracelular a un complejo proteico conocido como signalosoma, el cuál activa principalmente tres rutas de señalización (Cabal-Hierro y Lazo 2012). Por una parte la activación de las quinasas IKK promueve la fosforilación, inactivación y degradación del factor inhibidor de kappa-B ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$). Una vez liberado, la subunidad p65 del factor de transcripción NF- κ B queda expuesta y le dirige al núcleo, dónde NF- κ B regula la transcripción de genes asociados a la respuesta inflamatoria (Vallabhapurapu y Karin 2009). Por otra parte, el signalosoma también activa a las quinasas SAP (*stress activated protein*), p38 MAP y JNK (*Jun N-terminal kinase*) que fosforilan a la proteína c-Jun, siendo éste uno de los componentes del factor de transcripción heterotrimérico AP-1. Como en el caso anterior, AP-1 induce la transcripción de genes que codifican para proteínas que median en el proceso inflamatorio (Brenner et al. 1989). Además, el TNF se considera un factor proapoptótico, pues puede inducir apoptosis mediante la activación de la caspasa 8 (Vandenabeele et al. 2010). Además de inducir la síntesis de proteínas implicadas en la respuesta inflamatoria (citoquinas, moléculas de adhesión), el TNF señala al citoesqueleto de actina y las uniones intercelulares (Marcos-Ramiro, García-Weber, y Millán 2014). La combinación de todos estos procesos converge en la remodelación del endotelio para permitir el aumento de la permeabilidad vascular y la extravasación de las células inmunes.

1.4.2. Trombina

Tras la larga exposición del endotelio a la acción de las citoquinas proinflamatorias y los linfocitos activados se produce daño vascular, lo que estimula la liberación local de agentes protrombóticos en el *foci* inflamatorio, que inducen hiperpermeabilidad vascular aguda (Bombeli et al. 1997; Levi, van der Poll, y Schultz 2012). La trombina es una serina proteasa que actúa como mediador principal de la cascada de coagulación. Cuando se produce daño vascular, el factor de tejido entra en contacto con los factores de la coagulación que se encuentran circulantes en sangre. Se inicia entonces la cascada de coagulación, una serie de conversiones zimógenas que culmina con la conversión de protrombina en trombina activa. La trombina convierte a su vez el fibrinógeno circulante en monómeros de fibrina, que polimerizan para formar fibras de fibrina que unen las plaquetas entre sí y forman el trombo (Johari y Loke 2012). Además de estar implicada en la cascada de coagulación, la trombina tiene diversos efectos sobre distintos tipos celulares que participan en la respuesta inflamatoria. Activa a las plaquetas, induce cambios en su morfología y favorece

su agregación, actúa como quimioatrayente para los monocitos y agente mitogénico para los linfocitos, los fibroblastos y las células del músculo liso vascular, donde su acción también evoca la vasoconstricción. En el caso de las células endoteliales, la trombina induce cambios morfológicos, movilización de moléculas adhesivas a la superficie endotelial y producción de citoquinas (Coughlin 1999).

La acción de la trombina sobre las células endoteliales se ejerce a través de receptores PAR (del inglés *protease-activated receptor*). Los PAR son receptores acoplados a proteínas G que se activan por corte proteolítico de su dominio extracelular. Las células endoteliales expresan PAR-1, PAR-2, PAR-3 y PAR-4, siendo PAR-1 el más expresado y el responsable de los efectos de la trombina sobre el endotelio (Martorell et al. 2008). Éstos se inician cuando la proteasa corta el receptor PAR1 en su dominio extracelular, exponiendo un nuevo extremo amino-terminal que actúa como ligando del receptor, de tal forma que éste se autoactiva (Coughlin 2000). La asociación de PAR1 a distintas proteínas de la familia G (Hung et al. 1992; Offermanns et al. 1994) activa múltiples cascadas de señalización que son responsables de los efectos de la trombina sobre las células endoteliales (Vogel et al. 2000). El complejo PAR activo/proteínas $G\alpha_{12/13}$ recluta a proteínas activadoras de las Rho GTPasas (RhoGEFs), activando la señalización al citoesqueleto de actina que media los cambios morfológicos y la contracción celular (V. Vouret-Craviari et al. 1998). Además activa a la quinasa JNK que a su vez activa c-Jun. El complejo PAR1/proteína $Gq_{11\alpha}$ activa a la fosfolipasa C (Taylor et al. 1991), que hidroliza fosfoinosítidos de membrana. Esto provoca la movilización del calcio intracelular y la activación de la proteína quinasa C (PKC), así como la activación de la ruta de señalización de las quinasas MAP (p38MAPK y ERK 1/2). La activación de las quinasas MAP por PAR1 también se lleva a cabo alternativamente por la transactivación del receptor de crecimiento epidérmico (EGFR). PAR1/proteína $G_{i\alpha}$ inhibe la enzima adenilato ciclasa y la producción de adenosín monofosfato cíclico (AMPc). Por último, PAR1/proteína $G\beta\gamma$ induce la defosforilación de la quinasa fosfatidilinositol 3 (PI3K) y Akt (Martorell et al. 2008).

Todas estas rutas confluyen en la señalización a las uniones intercelulares (Sandoval et al. 2001) y en la inducción de la síntesis proteica y la producción de proteínas implicadas en la respuesta inflamatoria y procoagulante, como el factor activador de plaquetas (Zimmerman et al. 1996) y las interleuquinas 6 y 8 (K. Johnson et al. 1998). La contracción endotelial aguda promueve hiperpermeabilidad transitoria y edema, la secreción de interleuquinas refuerza y sostiene el evento inflamatorio y la activación de plaquetas unida a la producción de fibrina determina la formación de trombos. A escala local, la acción de la trombina es beneficiosa para controlar la infección y prevenir su diseminación. Sin embargo, el evento de coagulación actúa como un arma de doble filo y la coagulación intravascular diseminada o las trombosis microvasculares puede desembocar en un escenario patológico (Coughlin 2000). En aterosclerosis, se ha demostrado que la trombina contribuye a la desestabilización de la placa de ateroma al incrementar la permeabilidad endotelial, la deposición de plaquetas, la extravasación linfocitaria y la producción de mediadores inflamatorios (Croce y Libby 2007; Borissoff et al. 2009) y en modelos experimentales de esclerosis múltiple la inhibición de trombina suprime la inflamación y el progreso de la enfermedad (Han et al. 2008).

1.4.3. Relación bidireccional y efecto sinérgico entre el TNF y la trombina

Existe una relación bidireccional entre los eventos de inflamación y coagulación, de tal forma que ambos procesos se regulan entre sí (Levi, van der Poll, y Büller 2004; Popović et al. 2012). El evento de coagulación no puede producirse si no es en el contexto de un ambiente inflamatorio (Petäjä 2011). La producción de trombina tiene lugar a través de la cascada de coagulación, cuya iniciación viene determinada por la exposición del factor de tejido (TF del inglés *tissue factor*) al torrente circulatorio. El TF es una proteína transmembrana producida por células epiteliales, macrófagos y otros tipos celulares que normalmente no están en contacto con el torrente circulatorio. Sin embargo, tras la exposición prolongada del endotelio a la acción de citoquinas inflamatorias con capacidad proapoptótica, como el TNF, la IL-1 β y el IFN y la acción de los linfocitos activados se produce la muerte de células endoteliales, con la consecuente exposición de las células y macrófagos del tejido subyacente a la corriente sanguínea. También existe una fuente intravascular de TF, pues su síntesis puede ser estimulada por TNF, IL-1 β e IL-2 en monocitos, linfocitos y células endoteliales (Bevilacqua et al. 1986; Coughlin 2000).

Por otro lado, la trombina actúa en sinergia con el TNF, potenciando sus efectos. Se ha descrito que la trombina modula la expresión de proteínas cuya síntesis es estimulada por TNF y que están implicadas en la respuesta inflamatoria a largo plazo (Rahman et al. 1999; Cernuda-Morollón y Ridley 2006). Induce la síntesis de receptores de expresión, IL-6 e IL-8 en células endoteliales, de IL-8 en monocitos y macrófagos, induce su propia síntesis en plaquetas y la degranulación de los mastocitos (Petäjä 2011). De forma recíproca, se ha descrito que el TNF incrementa los efectos de la trombina en el endotelio de manera dependiente de la concentración de calcio intracelular (Tiruppathi et al. 2001) y provoca un notable retraso en la reformación de la monocapa tras la contracción endotelial inducida por trombina (Paria et al. 2004).

2. La familia de las Rho GTPasas

Uno de los eventos claves que hace posible la respuesta inflamatoria es el aumento de permeabilidad del endotelio inducido por las citoquinas inflamatorias. El cambio fenotípico de las células endoteliales requiere de la remodelación del citoesqueleto de actina, uno de cuyos principales reguladores es la familia de proteínas de las Rho GTPasas.

2.1. Miembros de la familia de las Rho GTPasas

Las proteínas Rho fueron por primera vez aisladas del ganglio abdominal de un gasterópodo marino del género *Aplysia* en 1985 (Madaule y Axel 1985) y desde entonces han sido implicadas en multitud de procesos celulares, desde la motilidad y la organización de las uniones intercelulares (Hall 1998; A. J. Ridley, Comoglio, y Hall 1995; Kuroda et al. 1997; Braga et al. 1997; Citi et al. 2014) hasta la expresión génica o el ciclo celular (A. J. Ridley 1995; Rajakylä y Vartiainen 2014). Todas las células eucariotas expresan alguna Rho GTPasa (Olofsson et al. 1988; Madaule y Axel 1985) y, a menudo, los ratones silenciados para algún miembro de la familia no son viables (Sugihara et al. 1998; Bustelo 2002; Heasman y Ridley

2008), lo que evidencia las funciones celulares esenciales que desempeñan estas proteínas.

Las proteínas Rho pertenecen a la superfamilia de proteínas Ras, compartiendo un 25% de identidad aminoacídica con H-Ras y presentando también un bajo peso molecular, en torno a los 21 kDa (Madaule y Axel 1985). En función de su secuencia aminoacídica, los 23 miembros de la familia Rho que por el momento se han identificado se pueden clasificar en 8 clases o subfamilias: Rho, Rac, Cdc42, Rnd, RIF, RhoBTB, RhoU/V y RhoH (Boureaux et al. 2007; Heasman y Ridley 2008). El primer miembro de la familia identificado fue RhoA en 1985 (Madaule y Axel 1985), después le siguieron Rac1 y Rac2 en 1989 (Didsbury et al. 1989) seguido de Cdc42 en 1990 (Munemitsu et al. 1990). Dado su temprano descubrimiento, no es de extrañar que estos tres miembros, RhoA, Rac1 y Cdc42, sean los más estudiados y mejor caracterizados de la familia.

2.2. Ciclo de activación e inactivación de las Rho GTPasas

La mayoría de los miembros de la familia Rho se caracterizan por ciclar entre un estado activo, en el que se encuentran unidos a nucleótidos de guanosina trifosfato (GTP) y un estado inactivo, en el que se encuentran unidos a nucleótidos de guanosina difosfato (GDP) (Etienne-Manneville y Hall 2002). La oscilación entre el estado activo e inactivo es regulado por dos clases de proteínas reguladoras: las proteínas activadoras de GTPasas o GAPs (del inglés *GTPase-activating proteins*) y los factores que intercambian el nucleótido de guanina o GEFs (del inglés *guanine nucleotide exchange factors*). Contrariamente a lo que pudiera pensarse, las GAPs promueven la inactivación de la proteína al inducir la hidrólisis del GTP, mientras que las GEFs intercambian el GDP por GTP e inducen la activación de la proteína. Además, la forma inactiva Rho-GDP suele encontrarse en el citosol unida a otra clase de proteínas reguladoras llamadas inhibidores de la disociación del nucleótido o GDIs (del inglés *nucleotide dissociation inhibitors*) (Bourne, Sanders, y McCormick 1991; Narumiya 1996). La disociación del GDI es necesaria para permitir la unión de la proteína Rho a un GEF que la active. Recientemente, se ha sugerido que las GDIs también podrían interaccionar con GAPs y GEFs inhibiendo su función y, por tanto, influyendo también indirectamente en la activación de las Rho (Ota et al. 2015). Además, las proteínas reguladoras de Rho GTPasas presentan así mismo sofisticados mecanismos de regulación que incluyen la autoinhibición, la retroalimentación positiva de las Rho GTPasas que han sido activadas y la fosforilación (Cherfils y Zeghouf 2013).

Las Rho GTPasas son modificadas postraduccionalmente por adición de un grupo lipídico a su extremo C-terminal. Puede ser un grupo prenilo: farnesil (15 carbonos) o geranilgeranil (20 carbonos) y/o un grupo palmitoil (Wennerberg y Der 2004). Una vez activadas, las proteínas Rho sufren un cambio conformacional y exponen el residuo prenilado, a través del cual pueden anclarse a la membrana plasmática, desde donde activan a sus proteínas efectoras. Cada Rho GTPasa presenta múltiples GEFs y GAPs capaces de regular su actividad y a su vez una GEF o GAP es capaz de regular distintas Rho GTPasas. Las múltiples combinaciones, así como la localización específica de cada una de estas proteínas en diferentes compartimentos celulares, originan una red de señalización que hace que la actividad de las Rho GTPasas esté estrechamente regulada (Moissoglu y Schwartz 2014).

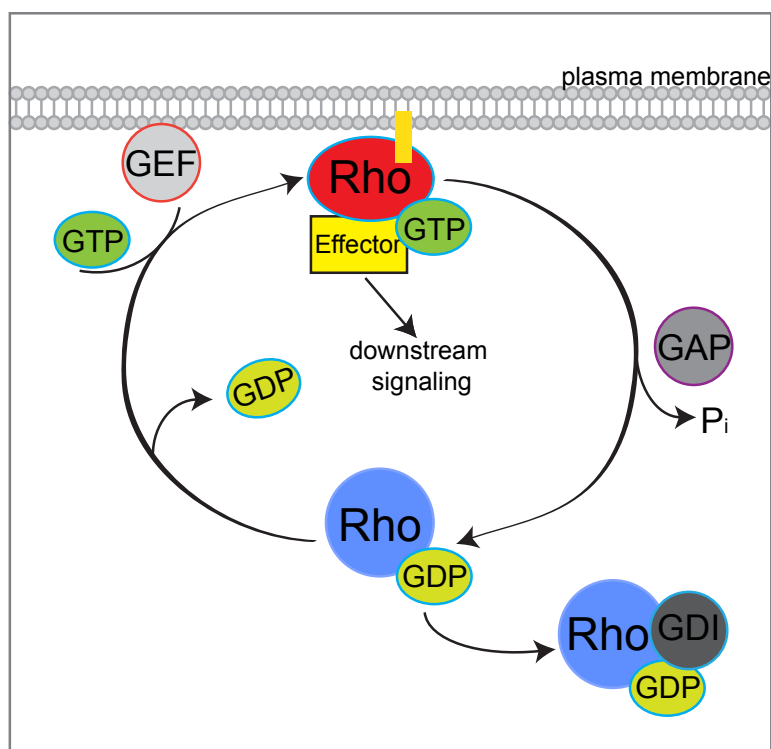


Ilustración 2. Ciclo esquemático de activación/inactivación de las Rho GTPasas. Las Rho GTPasas son interruptores moleculares que ciclan entre un estado inactivo marcado por la unión a GDP y un estado activo en el que se encuentran unidas a GTP. La activación es mediada por factores GEF que intercambian el GDP por GTP. Cuando se encuentran activas las proteínas Rho exponen un dominio lipídico a través del cual interaccionan con las membranas celulares y sufren un cambio conformacional que les permite interaccionar y activar a sus efectores. Después de desencadenar la correspondiente cascada de señalización, factores

GAP hidrolizan el GTP a GDP, quedando nuevamente la Rho GTPasa en su estado inactivo y terminando la señalización. Un tercer factor que regula la actividad de las Rho GTPasas son los GDI, que interaccionan con la forma inactiva y las mantienen en este estado en el citosol.

2.3. La subfamilia RhoA

En vertebrados superiores, la subfamilia de Rho GTPasas RhoA está formada por tres miembros: RhoA, RhoB y RhoC. Aunque las tres proteínas fueron identificadas al mismo tiempo (Madaule y Axel 1985), RhoB y RhoC han sido mucho menos estudiadas que RhoA. La alta identidad de secuencia existente entre ellas y el hecho de que, al igual que ocurre con RhoA, la sobreexpresión independiente de RhoB y RhoC induzca fibras de estrés en la célula (A. J. Ridley 2001) hizo que se diera por supuesto que las tres proteínas presentaban funciones redundantes. Lejos de ser verdad, estudios más recientes han revelado funciones específicas de cada proteína en diversos procesos celulares (Vega et al. 2011; Malissein et al. 2013; A. J. Ridley 2013).

2.3.1. Expresión

Las tres Rho GTPasas de esta subfamilia se expresan en todos los tejidos testados, aunque los niveles de expresión de cada una varían significativamente en función del tejido (Wheeler y Ridley 2004). Mientras que la expresión de RhoA y RhoC es más estable, la de RhoB varía significativamente. Los niveles de RhoB varían en respuesta a un gran número de estímulos a través de mecanismos tanto transcripcionales como postranscripcionales. RhoB aumenta su expresión en respuesta a la luz ultravioleta (Fritz, Gnad, y Kaina 1999) que activa su promotor (Fritz y Kaina 1997; Ahn et al. 2011). El factor de crecimiento transformante

(TGF- β) promueve la acumulación de RhoB al inhibir su degradación por el proteosoma (Engel, Datta, y Moses 1998), mientras que el factor de crecimiento epidermal (EGF) aumenta la transcripción de RhoB (de Cremoux et al. 1994). Las estatinas inducen un aumento en la expresión de RhoB a la vez que interfieren con la degradación de la proteína (Stamatakis et al. 2002). RhoB también aumenta su expresión en respuesta a citoquinas (Kroon et al. 2013). Sus niveles varían a lo largo del ciclo celular y el transcrito tiene una vida media de 30 minutos, sustancialmente más corta que la de RhoA y RhoC (Zalcman et al. 1995). Como reguladores principales del citoesqueleto de actina y la migración celular, la expresión de RhoA, RhoB y RhoC ha sido extensamente estudiada en cáncer. RhoA aumenta su expresión en diferentes tipos de tumores humanos y está implicada en la estimulación de la progresión del ciclo celular, la citocinesis y la migración celular (Karlsson et al. 2009; Vega y Ridley 2008). RhoB se considera un supresor de tumores ya que su expresión disminuye en diversos tumores humanos (M. Huang y Prendergast 2006). Además, el ratón deficiente de RhoB tiene mayor susceptibilidad a padecer tumores de piel inducidos por carcinogénicos (A. X. Liu et al. 2001). Sin embargo, el posible papel de RhoB en cáncer es controvertido, pues la expresión del mRNA de RhoB está aumentada en leucemia linfoblástica aguda (Bhavsar et al. 2013) y la variación de la expresión de RhoB entre las células del tumor de pecho y las células de los vasos sanguíneos asociados afecta a la progresión del tumor en ratones (Kazerounian et al. 2013). Por último, la expresión de RhoC parece inducir metástasis. RhoC correlaciona positivamente con metástasis en diversos tipos de cáncer (Karlsson et al. 2009). El silenciamiento de RhoC no afecta al crecimiento de tumor de pecho pero sí impide la metástasis en ratón (Hakem et al. 2005), mientras que la sobreexpresión de un dominante negativo de RhoC inhibe la metástasis de melanoma (Clark et al. 2000).

2.3.2. Modificaciones postraduccionales y localización

RhoA, RhoB y RhoC son idénticas en el 85% de su secuencia aminoacídica (Wheeler y Ridley 2004). La mayoría de las diferencias se encuentran en el extremo C-terminal, que es esencial para la correcta localización de estas proteínas. Como ocurre con la mayoría de las proteínas Rho, estas tres GTPasas son modificadas postraduccionalmente: son preniladas en un residuo de cisteína conservado en el extremo C-terminal, seguido de metilación y eliminación proteolítica de los tres últimos aminoácidos (Shao y Dixon 2003). Sin embargo, la longitud del grupo prenilo varía en función de la GTPasa. RhoB puede ser farnesilada, geranilgeranilada o palmitoilada, mientras que RhoA y RhoC solo pueden ser geranilgeraniladas (Katayama et al. 1991; Adamson et al. 1992). Este hecho genera una de las diferencias más importantes de RhoB con RhoA y RhoC. Las dos últimas se localizan en el citosol o la membrana plasmática cuando están activas. RhoB se localiza fundamentalmente en endosomas, además de en el citosol y en la membrana plasmática (Adamson, Paterson, y Hall 1992; Sandilands et al. 2004). La diferencia en la modificación postraducciona es la responsable de esta localización diferencial pues si se inhibe, la proteína muestra solo localización en la membrana plasmática (Wherlock et al. 2004) o acumulación en el citosol (Pérez-Sala et al. 2009; Oeste et al. 2014). Además, se ha demostrado que estas modificaciones postraduccionales son necesarias para la interacción de RhoA con otras proteínas, como GDIs (Hori et al. 1991) o para la degradación lisosomal de RhoB (Stamatakis et al. 2002; Valero et al. 2010).

PROTEIN	aa NUMBER	aa SEQUENCE
RhoA	1-60	MAAIRKKLVIVGDGACGKTCLLIVFSKDQFPEVYVPTVFENYVADIEVDGKQVELALWDT
RhoB		MAAIRKKLVVGDGACGKTCLLIVFSKDFPEVYVPTVFENYVADIEVDGKQVELALWDT
RhoC		MAAIRKKLVIVGDGACGKTCLLIVFSKDQFPEVYVPTVFENYIADIEVDGKQVELALWDT
		<div><div>GTP binding region 1 (residues 12-19)</div><div>effector binding (residues 34-42)</div><div>Switch I (residues 27-40)</div></div>
RhoA	61-120	AGQEDYDRLRPLSYPTDVIILMCFSIDSPDSLENIPEKWTPEVKHFCPNVPIILVGNKKD
RhoB		AGQEDYDRLRPLSYPTDVIILMCFSDSPDSLENIPEKWVPEVKHFCPNVPIILVANKKD
RhoC		AGQEDYDRLRPLSYPTDVIILMCFSIDSPDSLENIPEKWTPEVKHFCPNVPIILVGNKKD
		<div><div>Switch II (residues 59-78)</div><div>GTP binding region 2 (residues 59-64)</div><div>GTP binding region 3 (residues 116-120)</div></div>
RhoA	121-180	LRNDEHTRRELAKMKQEPVKPEEGRDMANRIGAFGYMECSAKTKDGVREVFEMATRAALQ
RhoB		LRSEHVRETELARMKQEPVRTDDGRAMAVRIQAYDYLECSAKTKEGVREVFETATRAALQ
RhoC		LRQDEHTRRELAKMKQEPVRSEEGRDMANRISAFGYLECSAKTKEGVREVFEMATRAGLQ
RhoA	181-196	ARRGKKK---SGCLVL
RhoB		KRYGSQNGCINCKVL
RhoC		VRKNKRR---RCPIIL
		<div>hypervariable region (residues 173-189)</div>

Ilustración 3. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de RhoA, RhoB y RhoC y dominios proteicos. RhoB presenta una homología en secuencia aminoacídica del 85% con RhoA, mientras que RhoC presenta un 92% de homología en secuencia aminoacídica con RhoA. Los residuos de RhoB y RhoC que divergen con respecto a los de RhoA se marcan en rojo. RhoB presentan tres aminoácidos más que RhoA y RhoC (marcados en azul). El residuo de cisteína en el extremo carboxi-terminal conservado en las tres proteínas donde se añade el grupo prenilo aparece marcado en morado. Las proteínas Rho presentan un dominio de unión a efector (rectángulo azul) y tres dominios separados de unión a GTP (rectángulos verdes) que forman la estructura donde se aloja el GTP cuando la proteína alcanza la estructura terciaria. La región amino terminal contiene además las regiones de cambio I (que contiene el dominio efector) y II (que contiene uno de los dominios de interacción con GTP) (rectángulos amarillos) que cambian su conformación entre el estado activo e inactivo, afectando así mismo a la región de interacción con efectores y de unión con GTP, lo que posibilita la interacción de la proteína Rho con ambos elementos. La región hipervariable (rectángulo naranja) del extremo carboxilo terminal es la que presenta mayor diversidad entre las tres proteínas. Se trata de una región rica en aminoácidos básicos que facilita la asociación con membrana.

2.3.3.Reguladores y efectores

La capacidad de RhoA, RhoB y RhoC para interaccionar con distintos reguladores y efectores ha sido poco estudiada. Pocos GEFs y GAPs han sido analizados para determinar su distinto grado de interacción con estas tres Rho GTPasas. Los GEFs p115RhoGEF, p190RhoGAP, PDZ-RhoGEF (PRG) y LARG (*leukemia-associated RhoGEF*) activan específicamente a RhoA, RhoB y RhoC y no a otros miembros de la familia Rho como Rac1 y Cdc42 (Jaiswal et al. 2011). Vav-2 activa a RhoA y RhoB (Schuebel et al. 1998). El GEF XPLN (del inglés *exchange factor found in platelets, leukemic, and neuronal tissues*), activa RhoA y RhoB, pero no RhoC (Arthur et al. 2002), mientras que SmgGDS (del inglés *small GTP-binding protein dissociation stimulator*) induce la carga GTP en RhoA y RhoC pero no en RhoB. RhoB carece de una secuencia polibásica en su extremo C-terminal que sí está presente en RhoA y RhoC y que es fundamental para la interacción con SmgGDS (Hamel et al. 2011).

Muchos de los efectores de Rho han sido identificados a través de RhoA (A. J. Ridley 2013).

Unos de los principales son las Rho quinasas I y II (ROCKI y ROCKII), reguladores claves de la dinámica del citoesqueleto de actina (Mutsuki Amano, Nakayama, y Kaibuchi 2010). Se ha descrito que RhoC es capaz de interactuar con mayor afinidad y activar ROCKI que RhoA, lo que en consecuencia produce que RhoC juegue un papel predominante durante la ruptura de las uniones intercelulares mediada por ROCK en células de carcinoma de colon (Sahai y Marshall 2002). Por otra parte, varios miembros de la familia de proteínas nucleadoras de actina forminas interactúan con Rho. La formina mDia1 parece interactuar específicamente con las tres miembros de la subfamilia RhoA mientras que mDia2 y mDia3 interactúan con otros miembros de las Rho GTPasas como Rac1 y Cdc42 además de con la subfamilia RhoA (Watanabe et al. 1997; Watanabe et al. 1999; Wallar y Alberts 2003).

De forma similar, las quinasas relacionadas con la proteína quinasa C (PRK/PKN, del inglés *Protein Kinase C-Related Kinase*) también interactúan con esta subfamilia. Un estudio reciente señala que RhoB tiene mayor afinidad que RhoA y RhoC para interactuar con las PRKs, en consonancia con la localización de PRK1 en endosomas (Hutchinson et al. 2013).

Por otra parte, otro efector, IQGAP1 interactúa con RhoA y RhoC, pero no con RhoB (Casteel et al. 2012).

Además, RhoA, RhoB y RhoC son capaces de activar a la fosfolipasa C épsilon (Wing et al. 2003).

En cualquier caso, dadas las escasas diferencias en el dominio de unión a efector entre RhoA, RhoB y RhoC, las tres proteínas deberían tener la capacidad de interactuar con los mismos efectores. Sin embargo, las diferencias en localización determinarían la interacción con distintos efectores y explicarían su especificidad funcional (A. J. Ridley 2013).

2.3.4. Funciones

Debido a la regulación que ejercen sobre el citoesqueleto de actina, la subfamilia RhoA presenta una función muy importante en morfología y migración celular. Su acción sobre las forminas mDia les permite estimular la polimerización de actina, mientras que a través de las quinasas ROCK son capaces de inducir la formación de fibras de estrés y la contracción por actomiosina (Anne J. Ridley et al. 2003). Así mismo, estos dos efectores de Rho regulan la organización de microtúbulos, fundamentales para el control del tráfico intracelular y la polaridad celular (Dachsel et al. 2013). Por tanto, estas tres proteínas también son fundamentales en la regulación de las uniones intercelulares y las adhesiones célula-matriz extracelular (Popoff y Geny 2009; Burridge y Wennerberg 2004). También regulan la citocinesis, que requiere de la contracción por actomiosina (Kaibuchi, Kuroda, y Amano 1999). Su implicación en desarrollo es evidente por el hecho de que la inhibición de las tres proteínas de la subfamilia RhoA es letal durante el desarrollo embrionario (Wei et al. 2002).

Pocos estudios han analizado la función diferencial de RhoA, RhoB y RhoC en estos procesos. En migración, RhoA regula preferencialmente el reciclaje de adhesiones focales en el frente de avance de la célula. Induce un incremento en el número y tamaño de adhesiones focales de integrina en muchos tipos celulares y es necesaria para la formación de podosomas en células dendríticas y endoteliales (A. Ridley 2000; Linder y Aepfelbacher 2003). RhoB regula negativamente la migración de células tumorales a través del control de

Akt1 y Rac1 en células bronquiales humanas (Bousquet et al. 2009). En células de cáncer de próstata, el silenciamiento independiente de cada proteína de la subfamilia RhoA resultó en diferencias significativas tanto en morfología como en migración. El silenciamiento de RhoA produjo una elongación de las células que emitían protrusiones en múltiples direcciones, el silenciamiento de RhoC un aumento en la extensión de las células sobre el sustrato, mientras que las células deficientes en RhoB aparecían más redondeadas y presentaron menor perímetro y extensión de la célula sobre el sustrato. Además, las células silenciadas para RhoA o RhoC presentaron una reducción en la velocidad de migración, mientras que las células deficientes de RhoB presentaron un aumento en la velocidad de la migración pero una disminución de la persistencia en la migración. Estos estudios revelaron que las tres proteínas favorecen la migración direccional, aunque actuando a través de distintos mecanismos moleculares. Mientras que RhoA regula a través de ROCK2 la actividad de Rac1 en las protusiones de membrana para limitar su número, RhoC a través del control de la formina FMNL3 restringe las dimensiones del lamelipodio y RhoB estabiliza al lamelipodio mediante la regulación de la actividad y los niveles en superficie de la integrina $\beta 1$ (Vega et al. 2011; Vega et al. 2012).

2.4. Las Rho GTPasas son reguladores esenciales del citoesqueleto de actina

Las primeras evidencias de que las proteínas Rho podrían regular el citoesqueleto de actina se remontan a 1990, cuando en el laboratorio del Dr. Hall se observó que la microinyección de una forma activa o inactiva de Rho en células 3T3 producía cambios en la morfología de la célula y en la organización de los filamentos de actina (Paterson et al. 1990), confirmándose más tarde que Rho inducía la formación de fibras de estrés y adhesiones focales (A. J. Ridley y Hall 1992). Siguiendo el mismo procedimiento se descubrió que Rac1 estimulaba la reorganización de la actina para formar lamelipodios (A. J. Ridley et al. 1992), Cdc42 inducía la formación de filopodios y ambas regulaban la formación de complejos focales asociados al lamelipodio y al filopodio (Nobes y Hall 1995). Los estudios subsiguientes han permitido esclarecer qué aspecto de la dinámica del citoesqueleto de actina regula cada miembro de la familia, así como los efectores y las rutas de señalización a través de los cuales actúan.

2.4.1. La vía de señalización Rho-ROCK y la generación de filamentos de actomiosina.

Las GTPasas de la subfamilia RhoA regulan el citoesqueleto de actina a través de sus efectores ROCK y mDia, que se encargan de favorecer la polimerización de actina y la formación de fibras de estrés a través de distintos mecanismos. Es bien conocido que, una vez activa, RhoA es capaz de activar a la formina mDia que se encarga de la nucleación y polimerización de filamentos de actina (Watanabe et al. 1997). Además, RhoA activa a la quinasa ROCK (Ishizaki et al. 1996; Matsui et al. 1996), que a su vez favorece la fosforilación de la cadena ligera de la miosina II, MLC (del inglés *myosin light chain*) a través de dos mecanismos. Bien fosforila MLC directamente (M. Amano et al. 1996) o fosforila e inactiva a la fosfatasa de MLC, MLCP (Kimura et al. 1996). Además, MLC puede ser fosforilada por las quinasas de la cadena ligera de la miosina o MLCK (del inglés *myosin light chain kinases*), reguladas por calcio intracelular (Bartelt, Moroney, y Wolff 1987). Una vez activa, la miosina cambia su conformación y es capaz de unirse a filamentos de actina y mediar su interacción hasta formar gruesos cables de actina llamados fibras de estrés.

Así mismo, la miosina II es capaz de deslizar los filamentos de actina uno sobre el otro, formando haces de actomiosina y generando una fuerza de contracción. Por otro lado, ROCK favorece la estabilización de los filamentos de actina al inhibir a la cofilina, cuya función es despolimerizar actina (Lappalainen y Drubin 1997). ROCK fosforila y activa a la quinasa LIM 1 (LIMK1) (Maekawa et al. 1999), que a su vez fosforila e inhibe la unión de la cofilina a la actina (N. Yang et al. 1998).

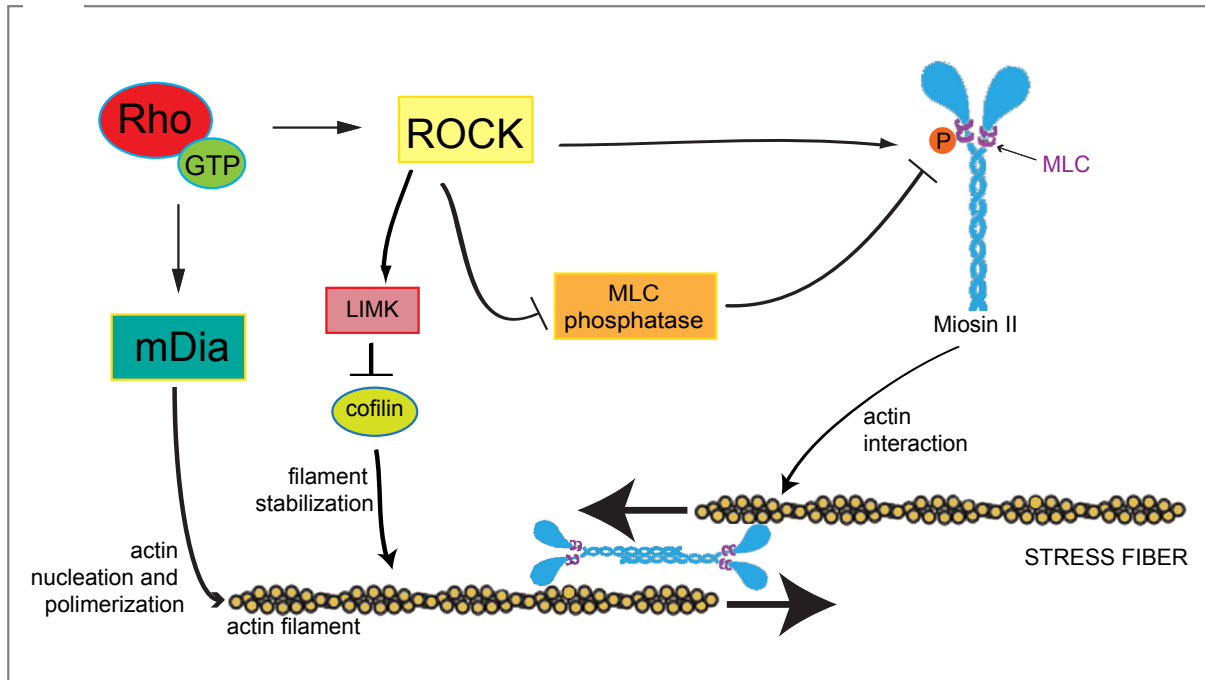


Ilustración 4. Esquema de la cascada de señalización intracelular que media la formación de fibras de estrés. La ruta de señalización Rho-ROCK dirige la formación de las fibras de estrés. Las proteínas de la subfamilia RhoA activas inducen la activación de mDia que favorece la nucleación y polimerización de actina para formar filamentos. Por otro lado, las proteínas de la subfamilia RhoA activan ROCK, que a su vez favorece la formación de las fibras de estrés por tres vías. Por un lado induce directamente la fosforilación de la cadena ligera de la miosina II (MLC) y además estabiliza dicha fosforilación al inhibir a la fosfatasa de MLC. Por otro lado, favorece la estabilización de los filamentos de actina mediante la fosforilación de LIMK que a su vez fosforila e inactiva a la cofilina.

2.4.2. Rac y la formación del frente de avance

Las Rho GTPasas Rac actúan sobre el citoesqueleto de actina que está asociado a la membrana plasmática y están implicadas en la formación de protusiones membranas típicas implicadas en migración, como lamelipodios y ondulaciones dorsales denominadas *ruffles* (Nobes y Hall 1995). La localización en la membrana plasmática de Rac (Kurokawa et al. 2004) y sus correspondientes GEFs es clave (Rossman, Der, y Sondek 2005), pues es donde también se sitúan sus efectores en este proceso (Sukumvanich et al. 2004). Rac1 es modificada postraduccionalmente por geranilgeranilación (Wennerberg y Der 2004), expone este dominio prenilado una vez activa y es translocada a la membrana plasmática bien directamente o por transporte vesicular (Donaldson, Porat-Shliom, y Cohen 2009). Una vez allí induce la polimerización de actina mediante la activación del complejo de proteínas WAVE (del inglés *WASP family Verprolin-homologous protein*), que a su vez activa el complejo Arp2/3 (del inglés *actin related proteins 2/3*) (Le Clainche y Carlier 2008). Arp2/3 es

un complejo de siete proteínas que se une a los lados de filamentos de actina preexistentes e induce la polimerización de actina desde este punto para formar una red de filamentos ramificados. Por otro lado, Rac es capaz de activar la kinasa LIM (LIMK) y regular la actividad de cofilina a través de efectores de la familia de *p21-protein activated kinase* (PAK) (Anne J. Ridley 2006). Además, la activación de Rac se asocia con la translocación de cortactina a la periferia celular, donde esta proteína estimula y estabiliza al complejo Arp2/3 y media la polimerización de actina (Birukov et al. 2002).

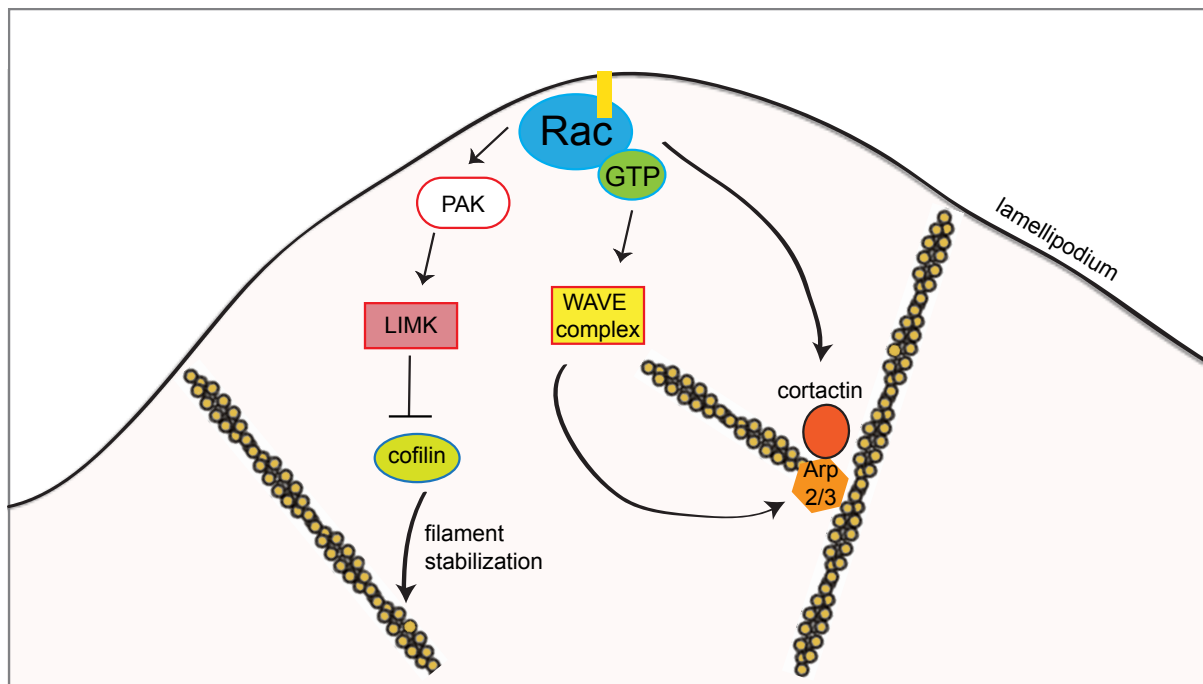


Ilustración 5. Esquema de la cascada de señalización intracelular que media la formación del lamelipodio. La GTPasa Rac dirige la formación del lamelipodio, que requiere de la polimerización de actina cortical. Una vez activada y anclada a la membrana plasmática a través de su dominio prenilado, Rac activa al complejo WAVE que a su vez activa al complejo Arp2/3, que induce la polimerización ramificada de filamentos de actina. Además, Rac recluta y activa a la cortactina, que estimula y estabiliza a Arp2/3. Por otro lado, Rac también es capaz de estabilizar los filamentos de actina activando LIMK e inhibiendo a la cofilina a través de su efector PAK.

2.5. Las Rho GTPasas son reguladores del tráfico vesicular

La primera evidencia de la implicación de las Rho GTPasas en el tráfico intracelular se remonta a 1992 y procede de la observación de que Rac1 activo estimulaba la internalización de fluido extracelular por macropinocitosis (A. J. Ridley et al. 1992). Hoy en día múltiples miembros de la familia de las Rho GTPasas han sido implicados en la regulación de las rutas de endocitosis y exocitosis a través de mecanismos relacionados con la alteración de las dinámicas del citoesqueleto de actina y la composición de fosfoinosítidos de las membranas celulares.

Las etapas iniciales de la mayoría de los procesos de endocitosis dependen de la síntesis de PI(4,5)P₂ y su conversión en diferentes fosfoinosítidos de membrana, como PI(3,4,5)P₃,

PI(3)P, PI(4)P, and PI(3,4)P₂), que actúan como moléculas de señalización para reclutar al resto de la maquinaria de endocitosis a la membrana plasmática (De Camilli et al. 1996; Posor et al. 2013; Di Paolo y De Camilli 2006). Las quinasas fosfoinosítido y las fosfatasas que median esta conversión se unen y son activadas por Rac1, RhoA y Cdc42 (Weernink et al. 2004; Seifert et al. 2004; Fritsch et al. 2013). Por otro lado, la iniciación y/o progresión a través de la ruta endocítica requiere de la polimerización y remodelación de actina, procesos controlados por las proteínas nucleadoras de actina y efectores de las Rho GTPasas WASPs/WAVEs y las forminas DRFs (Yarar, Waterman-Storer, y Schmid 2005; Chadda et al. 2007; Mooren, Galletta, y Cooper 2012).

En cuanto a la exocitosis, Cdc42 controla el tráfico entre el retículo endoplásmico y el Golgi, posiblemente a través de la capacidad de esta GTPasa de mediar la polimerización de actina en los estadios iniciales de la formación de la vesícula (Luna et al. 2002; Matas, Martínez-Menárguez, y Egea 2004). Rac1 se asocia con AP-1, una proteína adaptadora que media el tráfico entre el Trans-Golgi y el sistema endosomal (Edeling, Smith, y Owen 2006) e induce la polimerización local de actina en este compartimento (Anitei et al. 2010). Además, existen evidencias de que Rac1 regula la composición lipídica de la membrana del Trans-Golgi (van Rahden et al. 2012). La combinación de ambos elementos promueve la formación de la vesícula.

La localización de varias Rho GTPasas en compartimentos membranosos intracelulares evidencia su función en tráfico intracelular. RhoB fue el primer miembro de las Rho GTPasas que se localizó en vesículas intracelulares y ha sido implicado en el tráfico de efectores como mDia1 (Fernandez-Borja et al. 2005) y Src (Sandilands et al. 2004) y de receptores de membrana como EGFR (Gampel, Parker, y Mellor 1999). Una subpoblación de Cdc42, pero no de RhoA ni Rac1, se localiza en el Golgi (Erickson et al. 1996). Se ha demostrado que Cdc42 y su efector N-WASP regulan conjuntamente el transporte entre el Golgi y el retículo endoplásmico (Luna et al. 2002). RhoBTB1, RhoBTB2 y RhoBTB3 se localizan en vesículas (Aspenström, Fransson, y Saras 2004; Berthold, Schenkova, y Rivero 2008) y se ha observado que el silenciamiento de RhoBTB2 dificulta el transporte anterógrado del retículo endoplásmico al Golgi (Chang et al. 2006).

3. Las Rho GTPasas en la remodelación de la monocapa endotelial durante la respuesta inflamatoria

3.1. Eventos que regulan el aumento de permeabilidad endotelial en respuesta a TNF

El aumento de permeabilidad de la barrera endotelial es un elemento central de la respuesta inflamatoria. Como ya se ha mencionado, la citoquina TNF producida en el foco inflamatorio media en gran medida este incremento en una respuesta progresiva a largo plazo, a través de la remodelación del citoesqueleto de actina y de la morfología celular, pero también a través de la señalización por especies reactivas del oxígeno o por los receptores cuya síntesis induce

(Marcos-Ramiro, García-Weber, y Millán 2014). Los distintos miembros de la familia de las Rho GTPasas han sido implicados en todos estos procesos (Rolfe et al. 2005; Beckers, van Hinsbergh, y van Nieuw Amerongen 2010; Spindler, Schlegel, y Waschke 2010) y de hecho se ha descrito que TNF activa a los tres miembros más estudiados de la familia: RhoA, Rac1 y Cdc42 (Wójciak-Stothard et al. 1998, McKenzie y Ridley 2007, Kant et al. 2011).

3.1.1. Remodelación del citoesqueleto de actina y las uniones intercelulares

Uno de los efectos más evidentes de TNF sobre la monocapa endotelial es la remodelación de la morfología celular. Mientras que en condiciones de reposo el endotelio presenta un aspecto de pavimento, con células redondeadas que muestran un cinturón de actina cortical que mantiene a las células fuertemente adheridas entre sí, tras la estimulación aparecen gruesas fibras de estrés longitudinales a las células y éstas se alargan (Stolpen et al. 1986). Esta remodelación es consecuencia de la acción de TNF sobre el citoesqueleto de actina a través de la activación de las Rho GTPasas (Stolpen et al. 1986; Deli et al. 1995; Wójciak-Stothard et al. 1998). TNF activa RhoA, que a su vez activa la vía ROCK-MLC e induce la formación de fibras de estrés (Campos et al. 2009; McKenzie y Ridley 2007).

Además, las Rho GTPasas también actúan sobre la remodelación de las uniones intercelulares inducida por TNF a través de ROCK. Las uniones adherentes endoteliales o AJ (del inglés *adherens junctions*) son complejos multiproteicos. El componente fundamental de estas uniones es la cadherina endotelial (VE-cadherina), que establece interacciones homotípicas en el dominio extracelular entre dos células adyacentes. El dominio intracelular de VE-cadherina recluta a otras tres proteínas: p120-catenina, β -catenina y α -catenina, ésta última se encarga de anclar el complejo al citoesqueleto de actina (Dejana 2004). En el endotelio en reposo, las uniones adherentes son de aspecto heterogéneo, presentando una organización lineal perpendicular al eje de las células que unen y paralelas al anillo cortical (Cain, Vanhaesebroeck, y Ridley 2010) o reticular con ausencia de actina en las zonas donde se solapan regiones de dos células adyacentes (Fernández-Martín et al. 2012). La estimulación con TNF induce la remodelación de las uniones intercelulares, que pasan a organizarse en un patrón discontinuo y alineadas con las fibras de estrés, con las que interaccionan. De esta forma, las fibras de estrés y por lo tanto Rho-ROCK regulan la formación de las uniones discontinuas características del endotelio inflamado, que conectan fibras de estrés pertenecientes a dos células adyacentes (Millán et al. 2010).

3.1.2. Rac, las especies reactivas del oxígeno y permeabilidad endotelial

Las GTPasas de la subfamilia Rac han sido implicadas en el aumento de permeabilidad endotelial inducido por TNF. El silenciamiento individual de Rac1 tiene un efecto sutil sobre el aumento de permeabilidad mediado por TNF (Cain, Vanhaesebroeck, y Ridley 2010). Sin embargo la inhibición simultánea de Rac1, Rac2 y Rac3, todos los miembros de la subfamilia Rac que se expresan en el endotelio durante la inflamación, a través del inhibidor NSC-23766, impide completamente dicho incremento (Bandman et al. 2002). Rac está implicada en la remodelación morfológica inducida por TNF. La expresión de un mutante constitutivamente activo o de un mutante dominante negativo altera el incremento

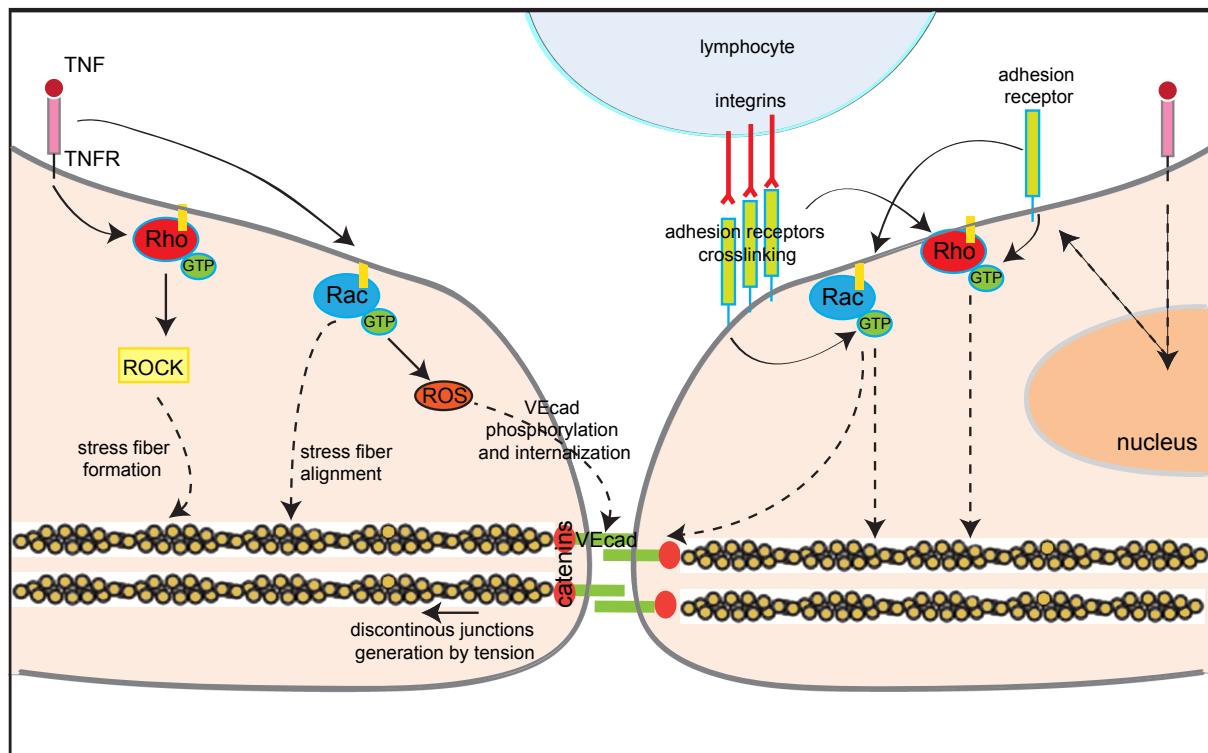


Ilustración 5. Señalización por TNF al endotelio: cambios morfológicos y aumento de la permeabilidad. La interacción de TNF con el receptor de la membrana del endotelio activa a las RhoGTPasas Rho y Rac. Rho activa ROCK y regula la formación de las fibras de estrés. Rac está implicado en la alineación de las fibras de estrés y el cambio en la morfología celular. La tensión generada por las fibras de estrés en las uniones intercelulares regula su redistribución en uniones discontinuas características del endotelio inflamado. Rac forma parte del complejo NADPH oxidasa y participa en la generación de especies reactivas del oxígeno. Las ROS activan el cambio en la expresión génica por NF- κ B e inducen la fosforilación de la VE-cadherina, con la consiguiente internalización de la proteína y la desorganización de las uniones intercelulares. Además los receptores de adhesión de la membrana plasmática cuya síntesis es regulada por TNF y el entrecruzamiento de estos receptores tras la interacción con el linfocito adherido retroalimentan y sostienen el aumento de permeabilidad a través de la activación de las moléculas mencionadas.

en actina filamentosa y la remodelación de las uniones intercelulares. El silenciamiento génico de Rac1 inhibe la elongación de las células endoteliales tras la estimulación con esta citoquina (Cain, Vanhaesebroeck, y Ridley 2010). Además, las GTPasas Rac forman parte también del complejo NADPH oxidasa (NOX) que se encarga de la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en células endoteliales (Bokoch 1994; Van Buul et al. 2005; Frey, Ushio-Fukui, y Malik 2009). TNF induce la generación de ROS (Kim et al. 2007; J.-M. Li et al. 2005) y se ha descrito que el silenciamiento del GEF de Rac P-Rex, la expresión de un dominante negativo de Rac o la inhibición de Rac con inhibidores específicos inhibe la producción de ROS inducida por TNF (Naikawadi et al. 2012). Las ROS, por un lado, activan la señalización por NF- κ B que induce la expresión de receptores de adhesión y, por otro, inducen la fosforilación de VE-cadherina, lo que provoca la internalización de la proteína, el desensamblaje de las uniones adherentes y el aumento de permeabilidad (Nwariaku et al. 2004; Gertzberg et al. 2004).

3.1.3. Rho GTPasas y la migración transendotelial de células del sistema inmunitario

La extravasación del linfocito a través del endotelio para alcanzar el tejido subyacente dañado requiere de cambios en el fenotipo vascular, tanto en la morfología de las células endoteliales como en el patrón de su expresión génica. Como se ha explicado anteriormente, las citoquinas inflamatorias inducen esta remodelación previamente a la interacción del linfocito con el endotelio. Sin embargo, ante el linfocito transmigrante, el endotelio actúa una vez más como un elemento dinámico y la propia adhesión de la célula inmune induce una reorganización de la membrana endotelial para favorecer la extravasación. La extravasación de linfocitos desencadena cascadas de señalización en la célula endotelial que retroalimentan los cambios morfológicos y el aumento de permeabilidad y amplifican la respuesta inflamatoria (Reglero-Real, Marcos-Ramiro, y Millán 2012). Por ejemplo, el entrecruzamiento de ICAM-1 como consecuencia de la adhesión del linfocito activa al GEF de Rac Trio y a la propia GTPasa (van Rijssel et al. 2012), que induce la producción de ROS (Wolf et al. 2013). El agrupamiento de ICAM-1 también induce el alineamiento del receptor con las fibras de estrés y la señalización por parte de este a RhoA, lo que activa la vía Rho-ROCK y estimula la generación de más fibras de estrés (Thompson, Randi, y Ridley 2002). Además, la activación de RhoA mediada por ICAM-1 podría abrir huecos en la monocapa debidos al cambio drástico de morfología celular (Etienne et al. 1998; Adamson et al. 1999). También VCAM-1, al entrecruzarse por acción del linfocito, se alinea con las fibras de estrés e induce la formación de más fibras de estrés (van Wetering et al. 2003; Millán et al. 2006). Así mismo, activa Rac1 e induce la apertura de huecos en la monocapa endotelial y la generación de ROS (van Wetering et al. 2002).

3.1.4. Rho GTPasas y señalización por trombina

En el contexto de la respuesta inflamatoria, el daño vascular favorece la liberación de señales procoagulantes. La proteasa trombina se genera localmente en zonas inflamadas e induce un aumento de permeabilidad en lo que se considera respuesta inflamatoria rápida y transitoria (Garcia et al. 1986; Birukova et al. 2004; Komarova, Mehta, y Malik 2007). Este aumento de permeabilidad viene determinado por la brusca contracción de la célula endotelial y requiere de la remodelación del citoesqueleto de actina a través de la activación de la ruta Rho-ROCK y la activación de MLCK dependiente de calcio. Se generan fibras de estrés que se anclan al sustrato a través de la formación de contactos o adhesiones focales. Las fibras de estrés generan poder de contracción por actomiosina y la rápida contracción celular induce la desestabilización de las uniones intercelulares y la aparición de huecos en la monocapa, lo que explica el rápido incremento de la permeabilidad. La hiperpermeabilidad puede provocar disfunción vascular severa y llegar a ser fatal, por lo que el efecto de la trombina sobre el endotelio no puede ser sostenido y la función de barrera debe recuperarse rápidamente (Garcia, Verin, y Schaphorst 1996). En el proceso de recuperación de la monocapa entran en juego varios elementos. En primer lugar, es necesario de nuevo una remodelación del citoesqueleto de actina: deshacer las fibras de estrés que mantienen a la célula contraída y relocalizar la actina en la periferia celular con el objetivo de favorecer la reexpansión de la célula sobre el sustrato y el contacto con las adyacentes. Así mismo, se produce la desorganización de los contactos focales que mantenían ancladas a las fibras de estrés al sustrato y se organizan otros nuevos en la periferia celular que responden a las necesidades de expansión de la célula. La reorganización de las uniones intercelulares es

también una parte fundamental del proceso de recuperación de la función de barrera.

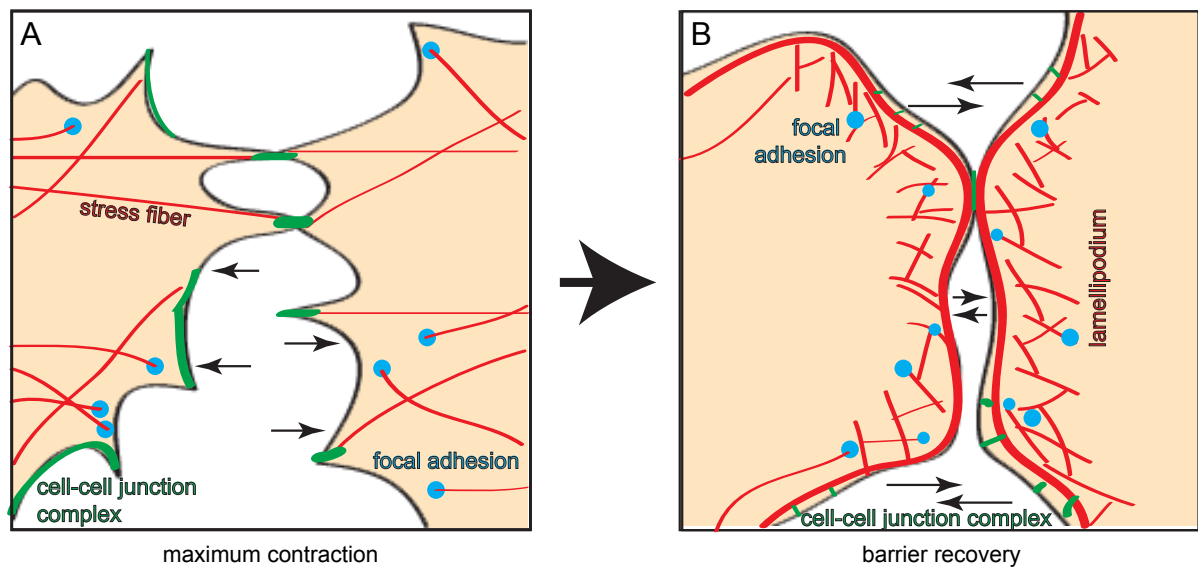


Ilustración 6. Mecanismos que regulan la contracción endotelial mediada por trombina. (A) La brusca contracción de la célula endotelial inducida por trombina se debe a la formación de fibras de estrés mediante la activación de la vía Rho-ROCK. Las fibras de estrés se anclan al sustrato a través de adhesiones focales y generan fuerza de contracción por actomiosina, lo que a su vez genera tensión en las uniones intercelulares. Éstas se desorganizan y aparecen huecos en la monocapa, lo que explica el rápido incremento de la permeabilidad. (B) La resolución del aumento de permeabilidad protrombótico requiere de la expansión de la célula endotelial sobre el sustrato a través de la polimerización de actina cortical, lo que permite a las células adyacentes re-contactar entre sí, reorganizar las uniones intercelulares y regenerar la monocapa endotelial.



OBJETIVOS

La permeabilidad del endotelio vascular es un elemento clave en la regulación del proceso inflamatorio y viene determinada por cambios en el citoesqueleto de actina. La subfamilia Rho de GTPasas son los reguladores por excelencia de la dinámica de la actina. Sin embargo, hasta la fecha ningún estudio ha analizado la función individual de cada proteína Rho en la respuesta inflamatoria. Para estudiar esta cuestión, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Analizar si la expresión de la subfamilia RhoA de las Rho GTPasas está regulada por el evento inflamatorio.
2. Investigar la aportación individual de las proteínas de la subfamilia RhoA al mantenimiento de la barrera vascular, el aumento de permeabilidad mediado por citoquinas inflamatorias, la trans migración leucocitaria y la disfunción endotelial que se produce en respuesta a agentes pro-coagulantes.
3. En caso de que las proteínas de esta subfamilia regulen alguno de estos procesos específicamente, caracterizar el mecanismo molecular que media su acción.

MATERIALES Y MÉTODOS



1. MATERIALES

1.1. Anticuerpos

1.1.1. Anticuerpos primarios

Los anticuerpos primarios empleados en inmunodetección (WB) y en inmunofluorescencia (IF) se describen en la tabla 1:

Tabla 1. Anticuerpos primarios

Proteína	Anticuerpo	Especie	Referencia	Dilución WB	Dilución IF
Akt	Anti-Akt	conejo	Cell Signaling 9272	1:1000	-
β -catenina	Anti- β -catenina	conejo	Sigma c2206	1:1000	1:500
mCherry	Anti-mCherry	conejo	Genetex GTX59788	-	1:1000
ERK1/2	Anti-ERK1 (K23)	conejo	Santa Cruz Biotechnology INC. sc-94	1:1000	-
Hemaglutinina (HA)	Anti-HA	rata	ROCHE 11867423001	-	1:500
ICAM-1	Anti-ICAM-1	conejo	Santa Cruz Biotechnology INC. sc-7891	1:1000	-
Cadena ligera de la Miosina (MLC)	Anti-MLC	conejo	Invitrogen 44-2604	1:500	-
myc	9E10	ratón	ROCHE 11667203001	-	1:500
PI3K (p85)	Anti-PI3K, p85	conejo	Merck Millipore 06-195	1:1000	-
p(S473)akt	Phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP	conejo	Cell Signaling 4060	1:1000	-
p(T308)akt	Phospho-Akt (Thr308) (C31E5E)	conejo	Cell Signaling 2965	1:1000	-

Paxilina	Anti-Paxilina	ratón	BD Transduction Laboratories 610051	1:10000	1:500
p(S19)cadena ligera de la Miosina	Anti-MLC (pS ¹⁹)	conejo	Invitrogen 44- 260G	1:500	-
p(Y31) Paxilina	Anti-Paxilina (pY ³¹)	conejo	Biosource 44- 720G	1:1000	-
p(S241)PDK1	Anti-PDK1 (pS241)	conejo	Cell Signaling 3061	1:1000	-
pPRK	Anti-PRK1 (Thr774)/ PRK2 (Thr816)	conejo	Cell Signaling 2611	1:1000	-
Rac1	Anti-Rac1	ratón	BD Transduction Laboratories 610650	1:1000	-
RhoA	Anti-RhoA (26C4)	ratón	Santa Cruz Biotechnology INC. sc-418	1:500	-
RhoB	Anti-RhoB (119)	conejo	Santa Cruz Biotechnology INC. sc-180	1:250	-
RhoB	Anti-RhoB (C5)	ratón	Santa Cruz Biotechnology INC. sc-8048	1:250	1:250
RhoC	Anti-RhoC (D40E4)	conejo	Cell Signaling 3430	1:1000	-
RhoC	Anti-RhoA (119)	conejo	Sc-179	1:100	-
VE-cadherina	Anti- Cadherina-5	ratón	BD Transduction Laboratories 610252	1:1000	1:500
VCAM-1	Anti- VCAM-1 (CD106)	cabra	R&D systems BBA19	1:1000	-

1.1.2. Anticuerpos secundarios

En la siguiente tabla se resumen los anticuerpos secundarios utilizados en inmunoblot y en inmunofluorescencia:

Tabla 2. Anticuerpos secundarios

Anticuerpo	Especie	Referencia	Dilución WB	Dilución IF
Anti-IgGs cabra HRP	Burro	Jackson Immunoresearch 705-036-147	1:5000	-
Anti-IgGs conejo HRP	Burro	GE Healthcare NA934V	1:5000	-
Anti-IgGs ratón HRP	burro	Jackson Immunoresearch 715-035-151	1:5000	-
Anti-IgGs conejo 488	burro	Invitrogen A-21206	-	1:500
Anti-IgGs rata 488	burro	Invitrogen A-21208	-	1:500
Anti-IgGs ratón 488	burro	Invitrogen A-21202	-	1:500
Anti-IgGs conejo 555	burro	Invitrogen A-31572	-	1:500
Anti-IgGs conejo 647	burro	Invitrogen A-31573	-	1:200
Anti-IgGs rata 647	burro	Invitrogen A-21247	-	1:200
Anti-IgGs ratón 647	burro	Invitrogen A-31571	-	1:200
Anti-IgGs ratón atto-647 N	cabra	Sigma 50185	-	1:200

1.2. Reactivos

Los reactivos empleados durante el desarrollo de esta tesis doctoral se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 3. Reactivos

Reactivo	Referencia	Casa comercial
To-Pro-3	T-3605	Invitrogen
NSC23766 (inhibidor de Rac1)	553502	Calbiochem
Dynasore (inhibidor I de dinamina)	CAS 304448-55-3	Calbiochem
LY294002 (inhibidor de PI3K)	L9908	Sigma
Monensina	475895	Calbiochem
SF1670 (inhibidor de PTEN)	SML0684	Sigma
Y-27632 (inhibidor de ROCK)	688000	Calbiochem
BrefeldinaA	20350-15-6	Sigma
hHGF	PHG0254	Gibco
Trombina	T6884	Sigma
TNF	210-TA/CF	R&D Systems
Interleuquina-1 β	201-LB	R&D Systems
Fibronectina humana	356008	Calbiochem
Jetpei	101-10N	Polyplus
Oligofectamina 2000	12252-011	Invitrogen
Faloidina-TRITC	P-1951	Sigma
Faloidina-Alexa647	A-22287	Invitrogen

1.3. Plásmidos

Durante el desarrollo de esta tesis se han empleado diferentes plásmidos que se indican en la siguiente tabla, con el marcador que coexpresan junto a la proteína de interés:

Tabla 4. Plásmidos

Plásmido	Expresión	Epítipo	Procedencia
GFP	GFP	-	Clontech
HA-RhoB V14	RhoB constitutivamente activo	HA	Dr. Dolores Pérez Sala (Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid)
mCherry-Rac1	Rac1	mCherry	Prof. Anne Ridley (Kings College, London, U.K.)
GFP-RhoB	RhoB	GFP	Dr. Dolores Pérez Sala (Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid)
HA-Akt	Akt 1	HA	Dr. Isabel Mérida (Centro Nacional de Biotecnología)
myc-RhoA	RhoA	Myc	Prof. Anne Ridley (Kings College, London, U.K.)
myc-RhoB	RhoB	Myc	Prof. Anne Ridley (Kings College, London, U.K.)
myc-RhoC	RhoC	Myc	Prof. Anne Ridley (Kings College, London, U.K.)
GFP-Rab5	Rab5	GFP	Dr. R. Puertollano (National Intitutes of Health, Bethesda)

1.4.Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados para los experimentos de PCR cuantitativa fueron sintetizados por Roche y los oligonucleótidos para los experimentos de interferencia (RNA de interferencia o siRNA) fueron obtenidos de la colección prediseñada siGenome de Dharmacon (Chicago, IL). Sus secuencias se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 5. Oligonucleótidos

1.4.1. Oligonucleótidos

Nombre	Secuencia 5'-3'
Primers RhoA	Izquierdo: gaagaggctggactcggatt Derecho: tcaccaacaatcaccagtttct
Primers RhoB	Izquierdo: tatgtggccgacattgagg Derecho: gcggtcgtagtcctcctg
Primers RhoC	Izquierdo: ccggaggctctacgtccctac Derecho: atagtcttctgcccctgctg
Primers β -actina	Izquierdo: caggcaccaggcgctg Derecho: gtgaggatgcctctcttgcct
Primers GADPH	Izquierdo: agccacatcgtcagacac Derecho: cgccaatacgaccaa

1.4.2. RNA de interferencia

Nombre	Secuencia 5'-3'
D-001210-01 (siControl)	AUGUAUUGGCCUGUAUUAGUU
D-001810-01 (siControl2)	UAGCGACUAAACACAUCAA
D-003860-01 (siRhoA)	AUGGAAAGCAGGUAGAGUUUU
D-008395-07 (siRhoB7/1)	GCAUCCAAGCCUACGACUA
D-008395-09 (siRhoB9/2)	CAUCCAAGCCUACGACUAC
D-008395-08 (siRhoB8/3)	ACACCGACGUCAUUCUCAU
(no mostrado en texto)	
D008555-02 (SiRhoC)	AUAAGAAGGACCUGAGGCAUU

2. MÉTODOS

2.1. Líneas celulares, cultivos primarios y condiciones de cultivo

Cultivos primarios humanos:

HUVEC (células endoteliales primarias humanas de vena de cordón umbilical)

HDMEC (células endoteliales humanas adultas microvasculares de la dermis)

PBL (linfocitos T de sangre periférica)

Líneas celulares humanas:

EA.hy.926 (línea endotelial derivada de HUVEC)

HepG2 (línea epitelial de hígado humano)

HeLa (línea epitelial derivada de adenocarcinoma)

HBMEC (línea endotelial de barrera hematoencefálica)

HEK293 (línea derivada de riñón de embrión)

Las células HeLa y HepG2 se obtuvieron de la *American Type Culture Collection* (Manassas, VA). Estas células, junto con las EA.hy.926, HBMEC y las HEK293 se crecieron en medio DMEM suplementado con glutamina al 1%, suero fetal bovino al 5% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 50U/ml penicilina y estreptomicina 50U/ml (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD). Las células EA.hy.926 fueron donadas por el Dr. C.S.J. Edgell (Universidad de Carolina del Norte, NC). Las células HBMEC fueron donadas por Babette Weksler (Cornell University, NY). Las células HEK293 fueron donadas por Isabel Correas (Universidad Autónoma, Madrid). Las células HDMEC (100 05a) y el medio de crecimiento CADMEC (112K-500) se obtuvieron de Tebu-bio. Los linfocitos T humanos se aislaron de sangre procedente de un sujeto sano mediante gradiente de Ficoll, se estimularon con 0.5% fitohemaglutinina durante 48h y posteriormente se cultivaron con IL-2 en medio RPMI durante al menos 7-12 días. Las células HUVECs se obtuvieron de Lonza (CC-2519, pool de cinco donantes) o fueron directamente extraídas de cordones umbilicales humanos. Se cultivaron en medio EBM-2 (Lonza, CC-3156, Walkersville, MD) suplementado con 2% de suero fetal bovino y el suplemento de crecimiento celular endotelial EGM-2 (Lonza, CC-3162). Las células HUVECs se cultivaron en *flasks* Nunclon que previamente habían sido incubados con 10 µg/ml de fibronectina humana durante al menos media hora. Excepto si se indica de otra forma, las células HUVECs fueron privadas de los factores de crecimiento durante al menos 1 hora antes de empezar el experimento en medio EBM-2 suplementado con 1% de suero fetal bovino y después estimuladas con TNF y/o trombina durante los tiempos indicados. En el caso de las HepG2, EA.hy.926, HeLa, HBMEC y HEK293 se les redujo el porcentaje de suero a un 2% durante al menos 1 hora antes de empezar el experimento y después fueron estimuladas con TNF durante el tiempo indicado.

Todos los cultivos se mantuvieron en incubadores a 37°C, con CO₂ al 5% y 95% de humedad.

2.2. Transfección de DNA y de RNA de interferencia

Para la transfección transitoria de los vectores de expresión anteriormente descritos, células HUVECs fueron sembradas el día anterior al 80-90% de confluencia y transfectadas con 1 a 5 μg de plásmido por cada millón de células mediante fosfato cálcico o el reactivo *Jetpei* según instrucciones del fabricante. A las 24 horas de la transfección, las células se sembraron sobre cristal (previamente recubierto con fibronectina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante al menos 2 horas a 37°C) o plástico a la confluencia adecuada y se procesaron a las 48 horas posteriores a la transfección. Para la transfección de oligonucleótidos sintéticos de RNA de interferencia, también llamados siRNA, en nuestro laboratorio hemos puesto a punto un método de transfección de alta eficiencia para cultivos primarios. Las células HUVECs fueron sembradas en subconfluencia (4×10^5 células en una placa de Petri de 60 mm de diámetro o P60 previamente cubierta con fibronectina) en medio EBM-2 sin antibióticos. Al día siguiente, las células fueron transfectadas mediante la mezcla en Opti-MEM + Gluta-MAX (Gibco by Life Technologies, 51985-026, NY) de 8 μl de Oligofectamina 2000 por placa con siRNA a una concentración final de 100 nM. A las 24 horas posteriores a la transfección, las células fueron tripsinizadas, centrifugadas y sembradas en confluencia en placas de cultivo o cubres de vidrio. Las células fueron procesadas 72 horas después de la transfección para experimentos de *western blot*, inmunofluorescencia, sistema ECIS, trans migración, permeabilidad y ensayo de *pull down*.

2.3. Ensayos de actividad de Rho-GTPasas por *pull-down*

La actividad de las Rho GTPasas se determinó por *pull-down* siguiendo un protocolo ya descrito (Ren y Schwartz 2000). Las construcciones GST-PBD-PAK y GST-Rtk bajo el control del promotor lac se transformaron en bacterias *E. coli* BL21. Para purificar las proteínas de fusión se indujo su expresión con IPTG. Posteriormente las bacterias se lisaron en buffer PBS frío (1mM DTT, 1 mM PMSF, 0,1% Tween 20 y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de leupeptina, aprotinina y pepstatina en PBS), se solubilizó la proteína de fusión por centrifugación y se purificó por unión a una resina de Sefarosa con glutatión. La cantidad de proteína de fusión purificada se cuantificó a través de un gel de poliacrilamida extrapolando el valor a una curva de diluciones de albumina de suero bovino (BSA) de concentración conocida. Posteriormente, células HUVECs fueron lisadas a 4°C en tampón de lisis (50mM Tris pH 7.4, 1% Triton X-100, 0,5M NaCl, 10mM MgCl_2 , 10% glicerol, 1mM EDTA pH8, 0,5% deoxicolato sódico, 0,1% SDS, 1mM PMSF, 1mM ortovanadato sódico y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de leupeptina, aprotinina y pepstatina) y los lisados aclarados por centrifugación para separar el sobrenadante postnuclear (PNS). Se utilizó una centésima parte de este sobrenadante para detectar la proteína soluble y el resto del volumen se incubó con 30-50 μg de proteínas recombinantes GST-PBD-PAK o GST-Rtk conjugadas a 30 μl de la resina Sefarosa con glutatión durante 35 minutos a 4°C en la noria. Posteriormente, la resina se lavó por centrifugación a baja velocidad a 4°C con tampón de lisis y las proteínas unidas se eluyeron añadiendo tampón de carga *Laemmli*, centrifugando 5 minutos a 12000 rpm e hirviendo las muestras 5 minutos a 94°C. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se detectaron con anticuerpos específicos.

2.4. Extracción de extractos proteicos celulares

Los extractos totales de proteínas procedentes de cultivos celulares se obtuvieron a partir de su lisis con solución de *Laemmli* (Laemmli 1970) a la que se le añadieron los siguientes inhibidores de proteasas y fosfatasa: 1mM PMSF, 10mM fluoruro sódico, 10µg/ml de leupeptina, aprotinina y pepstatina, 0,3µg/ml Caliculina A, 1mM ortovanadato sódico, 10mM β-glicerol fosfato. Posteriormente, los extractos fueron hervidos durante 5 minutos a 95°C para desnaturalizar las proteínas.

2.5. Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE), electrotransferencia e inmunodetección (*Western-blot*)

Los extractos proteicos preparados en solución *Laemmli* se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia del detergente desnaturizante SDS (SDS-PAGE) y en condiciones reductoras, con el sistema de electroforesis *Mini-PROTEAN II* (Bio-Rad). Como marcadores se utilizó la mezcla de proteínas de pesos moleculares conocidos comprendidos entre 10 y 250 kDa, *Dual Color* (Bio-Rad). Los geles se corrieron a un amperaje constante de 30 mA por cada gel durante 1 hora, en una solución tamponada con 25 mM Tris, 130 mM glicina y SDS 0,1% (p/v).

En el caso de los ensayos de *pull-down*, los geles para el cálculo de la concentración de la proteína recombinante se fijaron y tiñeron con una solución compuesta por 2,5 g/l de *Coomassie Brilliant Blue* (Boehringer Ingelheim), metanol al 40% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v) durante 30 minutos. Se destiñeron eliminando el colorante no unido con una solución de metanol al 45% (v/v) y ácido acético al 7%.

En la inmunotransferencia, las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron desde el gel a una membrana de *Immobilon®-PVDF* (Millipore) en una solución de Tris-Glicina pH 8,6 y MeOH 20% usando el sistema *Mini Trans-Blot* (Bio-Rad). Las transferencias se realizaron durante 1 hora a un voltaje de constante de 100V. Las membranas se bloquearon con leche en polvo desnatada al 5% (p/v) o con BSA al 5% (en caso de querer observar proteínas fosforiladas), ambas disueltas en TBS (25 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl) con Tween-20 al 0,05% (v/v), durante 1 hora. Se incubaron con el anticuerpo primario durante la noche a 4°C, y después se lavaron durante 10 minutos tres veces consecutivas en TBS con Tween-20 al 0,05% (v/v). Para la inmunodetección de los complejos antígeno-anticuerpo sobre las membranas, se usaron anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa (HRP). Las membranas se incubaron durante 30 minutos con los anticuerpos secundarios y se lavaron posteriormente 6 veces durante 10 minutos en TBS-Tween-20 al 0,05%. La detección de las proteínas se realizó mediante la reacción quimio-luminiscente catalizada por la peroxidasa de rábano unida a los anticuerpos secundarios usando los reactivos ECL (*Enhanced ChemiLuminescence*) de Amersham Pharmacia Biotech y película fotográfica de Kodak.

Para la cuantificación de la señal de *western-blot*, se empleó el programa image J.

2.6. Inmunofluorescencia y microscopía confocal

Las células se crecieron sobre cubreobjetos en placas de pocillos de fondo plano (Costar Corp., Cambridge, MA) y se fijaron utilizando una disolución de formalina (Formaldehído al 37%; Sigma-Aldrich) al 10% (v/v) en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. El exceso de formaldehído se bloqueó incubando 5 minutos con una solución 10 mM de glicina en TBS. Las células fijadas se permeabilizaron posteriormente con *Tritón X-100*, al 0,2% (v/v) en TBS a 4°C y se bloquearon con una solución 3% de BSA en TBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, los cubres se incubaron durante 30 minutos a 37°C secuencialmente con los anticuerpos primarios apropiados a diferentes diluciones en la misma solución de bloqueo, los anticuerpos secundarios acoplados a distintos fluoróforos y faloidina acoplada a fluoróforos, intercalando lavados con TBS entre cada incubación. Finalmente se prepararon las muestras con el medio de montaje Fluoromont (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, AL). Las preparaciones se analizaron en un microscopio confocal LSM 510 acoplado a un microscopio invertido de Zeiss modelo *Axiovert 200 M*. Todas las imágenes obtenidas fueron procesadas empleando los programas LSM 5 Image Browser, Adobe Photoshop 7.0 y Adobe Illustrator 10.

Las cuantificaciones se realizaron con el programa ImageJ. Para la cuantificación de la intensidad de β -catenina y de actina filamentosa (F-actina), se utilizó la herramienta *threshold* (herramienta que permite seleccionar los píxeles a partir de un determinado umbral que el usuario establece) seguida de la herramienta *analyze particles* (herramienta que permite crear regiones a partir de un grupo homogéneo de píxeles seleccionados) para crear una región que específicamente seleccionara la señal de β -catenina o F-actina y se cuantificó la intensidad media de los píxeles incluidos en esta región. Para la cuantificación del área celular se partió de imágenes de células subconfluentes teñidas para F-actina. De nuevo usando las herramientas *threshold* y *analyze particles*, se creó una región que englobaba toda la célula y cuya área fue cuantificada.

Para la cuantificación de mCherry-Rac1 en membrana, el área de células subconfluentes transfectadas con la construcción y teñidas para F-actina fue seleccionada como se acaba de indicar y se cuantificó la intensidad media de los píxeles correspondientes a la señal de mCherry-Rac1 contenidos en dicha región. Para crear un área que sólo englobara la región de la membrana plasmática o el borde celular, la región área de la célula fue reducida de 5 a 10 píxeles según la anchura de la membrana en cada célula con la herramienta *enlarge* y luego se creó una banda que englobaba los píxeles reducidos con la herramienta *make band*. La intensidad media de los píxeles correspondientes a la señal de mCherry-Rac1 contenidos en esta banda fue cuantificada. Para normalizar la intensidad de la señal de mCherry-Rac1 en membrana y solventar diferencias debidas a la cantidad de plásmido transfectada en cada célula en vez de a diferencias reales debidas al cambio de localización de mCherry-Rac1, se dividió el valor de intensidad en membrana entre la intensidad de la señal de mCherry-Rac1 en el área total de la célula.

Para observar la integridad de la monocapa de manera más clara, se utilizó la herramienta *threshold* seguida de la herramienta *analyze particles* para crear una región que englobara los píxeles menos intensos (que se corresponden con los agujeros en la monocapa). Esta región se coloreó de azul y se superpuso a la imagen original.

Para la video-microscopía se utilizó un microscopio *Axiovert200* (Zeiss) equipado con una

cámara ambiental a 37°C. Las células fueron sembradas en placas de plástico con el fondo de cristal (MatTek, Ashland, MA, USA). Antes de iniciar el experimento, se cambió el medio a EBM-2 sin rojo fenol y se añadió HEPES 20mM a pH 7.4. La adquisición de imágenes *in vivo* se realizó con una cámara CCD Hamamatsu Orca-ER C4742-95. La cámara y el obturador (*Lambda Instruments*) fueron controlados a través del programa *Andor Q*. Los vídeos se procesaron con Image J.

2.7. Microscopía confocal de alta resolución

Para la Microscopía de Reconstrucción Óptica Estocástica (STORM), se sembraron células HUVECs en placas de 35 mm de diámetro (IbiTreat, IBIDI). Tras 24 horas las células fueron tratadas con TNF durante 7 horas, con trombina a los tiempos indicados y fijadas. La inmunofluorescencia se llevó a cabo como ya se ha descrito, utilizando un anticuerpo secundario acoplado a un fluoróforo 647N-atto. Antes de comenzar el escaneo, las células se lavaron una vez con agua destilada y fue añadido el buffer para microscopía STORM (10 mM Tris (pH 8.0), 2 mM NaCl, 2% Glucosa, 150 mM Cisteamina, 60 mM Glucosa Oxidasa, 2 mM Ciclooctatetraeno). La microscopía de alta resolución se llevó a cabo con un microscopio Nikon Eclipse Ti-E Invertido (Nikon, Japón) con una cámara acoplada Andor Ixon controlado por el programa NIS Elements AR. Las imágenes de alta resolución obtenidas fueron procesadas con el complemento de Image J QuickPalm (Henriques et al. 2010). El análisis de la agregación de las partículas se llevó a cabo a través de la función K de Ripley's (Kiskowski, Hancock, y Kenworthy 2009) programada en Dev-C++.

La microscopía de emisión depleción estimulada (STED) se llevó a cabo con un microscopio TCS SP5 II STED de Leica (Leica, Alemania), usando el láser STED para modificar la fluorescencia emitida por el fluoróforo ATTO-647N. La excitación se llevó a cabo a 635nm con un láser de diodo pulsado y la des-excitación a 750nm con un láser MaiTai fs sintonizable. Para facilitar la observación, las imágenes de alta resolución obtenidas con STED son presentadas en escala de grises invertida.

2.8. Inmunohistoquímica

El análisis inmunohistoquímico de muestras de tejidos humanos se realizó en colaboración con los Hospitales Universitario Central de Asturias y Universitario de Salamanca. Los análisis fueron aprobados por los Comités Éticos de ambos hospitales. Además de las biopsias de las enfermedades que se indican, los controles provienen de donantes sanos o de tejido de hígado o intestino no afectado y retirado de pacientes con carcinoma.

Secciones de tejido de 4 mm de grosor fijadas con formalina y embebidas en parafina fueron desparafinadas en xileno y rehidratadas en una batería de soluciones de alcohol de porcentaje decreciente. Tras inhibir la peroxidasa endógena (peróxido de hidrogeno al 3% (v/v) durante 10 minutos) y desenmascarar los epítomos (hirviendo en tampón citrato 10mM, pH 6 durante 10-15 minutos), se bloquearon las muestras con suero (de la especie animal del anticuerpo secundario) al 2.5% en PBS durante 30 minutos. Posteriormente las muestras se incubaron con el anticuerpo primario durante una hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda y seguidamente se lavaron con PBS y se incubaron con el

anticuerpo secundario biotinilado correspondiente durante 30 minutos. Tras volver a lavar se incubó el complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa (VECTASTAIN ABC Reagent, Vector Laboratories) durante otros 30 minutos y finalmente las proteínas marcadas se visualizaron utilizando DAB (Dako). Para la contratinción se utilizó hematoxilina de Mayer. En cada experimento se llevó a cabo un control negativo para asegurar la especificidad de los anticuerpos incubando las muestras únicamente con el anticuerpo secundario. En este caso no se detectó tinción alguna. La inmunohistoquímica también se realizó en sistema completamente automatizado (Bond III, Leica).

2.9. Ensayo de actividad PI3K

Los ensayos de actividad de PI3K fueron realizados en colaboración con Pedro Ayuso del laboratorio de la Dr. Isabel Mérida, en el Centro Nacional de Biotecnología. Células HUVECs previamente tratadas con siRNA y estimuladas como se indica fueron lisadas en buffer de lisis Tritón-X100 (50mM Hepes pH 7.5, 150mM NaCl, 1% Tritón X-100, 10% glicerol, 1mM ortovanadato sódico, 1mM NaF, 1mM PMSF, 10µg/ml aprotinina, pepstatina y leupeptina). Tras dejar en agitación 30 minutos a 4°C, 150 µg del lisado se incubó con un anticuerpo anti-p85, dirigido contra la región constante de la clase IA de la PI3K, durante 2 a 3 horas. A continuación se añadió proteína G, que había sido previamente bloqueada con BSA 3% y se incubó durante una hora. El inmunoprecipitado se lavó una vez con buffer de lisis, dos veces con Hepes 100 mM pH 7.0 + 250 mM LiCl, dos veces con Hepes 10 mM pH 7.0 + 100 mM NaCl + 1 mM EDTA y tres veces con Hepes 10 mM pH 7.0. Como sustrato de la PI3K se utilizó fosfatidilinositol (PI). Las micelas de PI se prepararon por sonicación del lípido en Hepes 10 mM pH 7.0 durante 5 minutos a temperatura ambiente. La concentración final del lípido en el ensayo fue de 0,2 mM. La reacción se inició por la adición de la mezcla de reacción (100 mM MgCl₂, 200 µM ATP frío y 10 µCi [γ -³²P]-ATP), que se incubó durante 30 minutos a 25°C en un volumen final de 50 µl. La reacción se terminó por la adición de 50 µl de 1N de HCl. Los lípidos fueron extraídos por adición de CHCl₃/MeOH (1:1, v/v). Se recogió la fase orgánica, se secó y los lípidos producto se separaron en cromatografía de capa fina (TLC). Para ello, la fase orgánica se aplicó en placas de gel de sílice (Whatman) y se corrió en un tanque básico CHCl₃/MeOH/NH₃ 4,5M (9:7:2, v/v/v). La placa fue secada y autorradiografiada. Un estándar no radioactivo de la reacción producto se usó para identificar el lípido de interés.

2.10. Ensayos de permeabilidad y trans migración

Para los ensayos de permeabilidad y trans migración, células HUVECs previamente transfectadas con distintos siRNA fueron sembradas en confluencia en el fondo superior de pocillos de doble fondo llamados *transwells* (Costar, Corning, NY) de 6,5 mm de diámetro y tamaño de poro 0,4 µm para los ensayos de permeabilidad o 3 µm para los ensayos de trans migración. Los *transwells* fueron previamente incubados con fibronectina.

Para los ensayos de permeabilidad, tras 24 horas se cambió el medio a las células y se estimularon o no con 10 ng/ml de TNF. Tras 20 horas, se añadió 0,1 mg/ml de dextrano acoplado a FITC (Mr 42,000; Sigma-Aldrich) a la cámara superior, se dejó equilibrar durante 60 minutos y después se recogió una muestra del medio de la cámara inferior cuya

fluorescencia se midió en un fluorímetro *Fusion α-FS*.

Para los ensayos de trans migración, tras 48 horas se cambió el medio a las células y se estimularon con 10 ng/ml de TNF durante 7 horas. Mientras, linfocitos T de sangre periférica (o PBLs, extraídos en el laboratorio a partir de la sangre de donantes) fueron lavados dos veces en medio RPMI sin suero y marcados con la sonda fluorescente verde calceína a 0,5 μ M durante 30 minutos. Los linfocitos fueron lavados dos veces con RPMI suplementado con suero al 10%, añadidos a la cámara superior de cada pocillo (1,5x10⁶ por pocillo) e incubados durante 2 horas a 37°C en presencia del quimioatrayente SDF-1 α (50 μ g/ml) en la cámara inferior. Los linfocitos transmigrados se cuantificaron recogiendo una muestra del medio de la cámara inferior y midiendo su fluorescencia en un lector de placas (FLUOstar OPTIMA, BMG Labtech) provisto de los filtros para la emisión de 480 nm.

2.11. Ensayos de medición de la resistencia transendotelial

Para la medición de la resistencia transendotelial (TEER) se utilizó un sistema sensitivo de la impedancia eléctrica célula-substrato (ECIS® 1600R; *Applied Biophysics*, Troy, NY). Este sistema permite medir cambios en la permeabilidad endotelial en tiempo real. Las células son sembradas en pocillos en cuyo fondo hay electrodos de oro. El aparato emite una corriente eléctrica a través de estos electrodos que encontrará una determinada resistencia a atravesar la monocapa de células endoteliales. A mayor resistencia eléctrica, menor será la permeabilidad endotelial y viceversa.

Para llevar a cabo estos experimentos, células HUVECs previamente transfectadas con los siRNA indicados fueron sembradas en confluencia a una densidad 2 x 10⁵ células/cm² sobre placas de ECIS de 8 pocillos y 10 electrodos por pocillo (8W10E arrays; IBIDI, Martinsried, Germany) previamente recubiertas con 200 μ g/ml de fibronectina diluida en agua destilada estéril durante al menos dos horas. Tras 48 horas, el medio de las células fue sustituido por medio sin factores de crecimiento y al 1% de suero, las placas fueron conectadas al aparato y las células estimuladas con TNF (10 ng/ml). El efecto del TNF en la permeabilidad endotelial fue monitorizado a 4000 Hz de frecuencia durante 7 horas. Después, las células fueron estimuladas o no con trombina (1 U/ml) en presencia o ausencia de los inhibidores indicados y su efecto en la permeabilidad monitorizado a 4000 Hz durante al menos 3 horas. Todos los datos fueron normalizados antes de proceder a las cuantificaciones en función de la resistencia media de las monocapas endoteliales antes de los tratamientos. El porcentaje de la disminución de TEER se calculó restando a la unidad cada valor de resistencia a tiempos fijos y teniendo en cuenta la resistencia del pocillo vacío (300 ohms). El porcentaje de contracción tras la estimulación con trombina se calculó restando a la unidad cada valor de resistencia normalizada a tiempos fijos y normalizando en función del valor de resistencia en el máximo punto de contracción de las células transfectadas con el siRNA control.

2.12. Análisis estadístico

Las medias aritméticas, el error estándar y las significaciones estadísticas usando la prueba *t* de Student fueron calculadas con el programa *Microsoft Excel*.

RESULTADOS



1. RhoB humano se expresa en el endotelio de vasos sanguíneos en respuesta a la inflamación

Durante la respuesta inflamatoria, las células implicadas en el proceso producen citoquinas proinflamatorias como TNF o IL-1 β que modulan la permeabilidad de la pared vascular. Ambas presentan un papel relevante en muchas de las patologías humanas más prevalentes (Mrak y Griffin 2001; Balkwill 2006; McKellar et al. 2009; Pal et al. 2014; Fragoso et al. 2014). Estas citoquinas disparan un programa transcripcional en el endotelio que induce la expresión de proteínas que alteran la barrera endotelial y que son necesarias para el mantenimiento de una respuesta inflamatoria sostenida. Con la intención de identificar nuevas proteínas que regulen la permeabilidad endotelial durante la respuesta inflamatoria, en nuestro laboratorio se han combinado técnicas de proteómica, de inmunodetección y PCR cuantitativa para encontrar proteínas cuya expresión aumente en respuesta a estímulos proinflamatorios y que no hayan sido previamente implicadas en la respuesta inflamatoria.

1.1. TNF e IL-1 β aumentan la expresión de RhoB en células endoteliales humanas

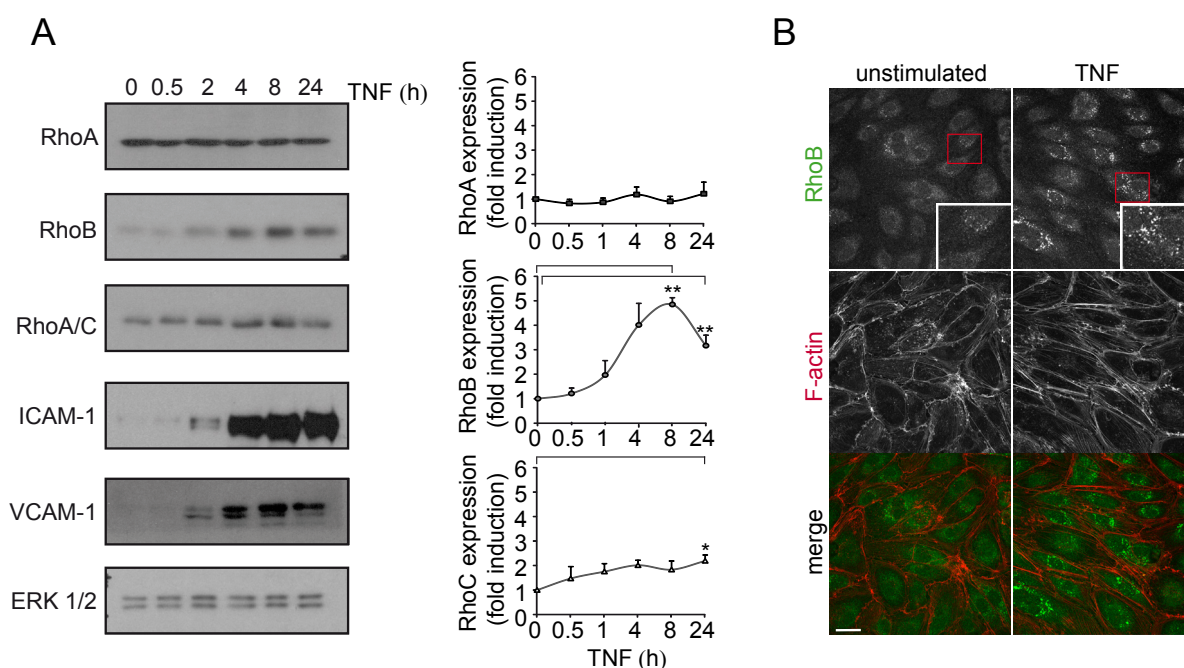


Figura 1. TNF aumenta la expresión de RhoB en HUVECs. (A) Las células HUVECs se cultivaron con niveles reducidos de nutrientes durante 12 h y fueron estimuladas con TNF a distintos tiempos, lisadas y analizadas por inmunodetección con los anticuerpos indicados. Los gráficos de la derecha muestran la cuantificación de los cambios de expresión de RhoA, RhoB y RhoC en respuesta a TNF y representa el promedio de tres experimentos independientes más el error estándar del promedio (SEM). **, p-valor= 0.001; *, p-valor= 0.02. (B) Las células HUVECs no estimuladas o estimuladas con TNF durante 7 horas fueron fijadas, teñidas con un anticuerpo frente a RhoB y con faloidina acoplada al fluoróforo TRITC para detectar la actina filamentosa y observar la morfología celular. TNF produjo la elongación de las células endoteliales y un incremento de la tinción vesicular y citoplasmática de RhoB (ver áreas aumentadas). Barra de escala, 20 μ m.

Entre las Rho GTPasas cuya expresión fue analizada, detectamos que la expresión de RhoB se vio incrementada en respuesta a TNF en HUVECs. Una cinética más detallada de estimulación con esta citoquina mostró que la expresión se incrementa un máximo de 5 veces tras 8 horas de estimulación, manteniéndose elevada hasta 24 horas después (máximo tiempo de estimulación testado). En el mismo conjunto de experimentos también se analizó la expresión de las otras dos Rho GTPasas pertenecientes a la misma subfamilia, RhoA y RhoC. Mientras que no encontramos cambios inducidos por TNF en la expresión de RhoA, observamos un incremento moderado (dos veces) en la expresión de RhoC (Fig. 1A). RhoB se localiza en endosomas, en el citosol y en la membrana plasmática (Sandilands et al. 2004). El análisis por inmunofluorescencia de RhoB endógeno en células HUVECs evidenció que el aumento en la expresión de la proteína se produjo mayormente con un patrón vesicular sugerente de la existencia de un incremento de RhoB en el compartimento endosomal (Fig. 1B). El aumento en la expresión de RhoB no es exclusivo de células HUVECs, puesto que también fue observado en células microvasculares de la dermis humana (HDMEC) (Fig. 2A, B), en líneas celulares endoteliales de médula osea, como HBMEC (Fig. 2C) y EA.hy.926, también llamadas HUVEC inmortales, así como en menor medida en células epiteliales, como HeLa o HepG2 (Fig. 2D).

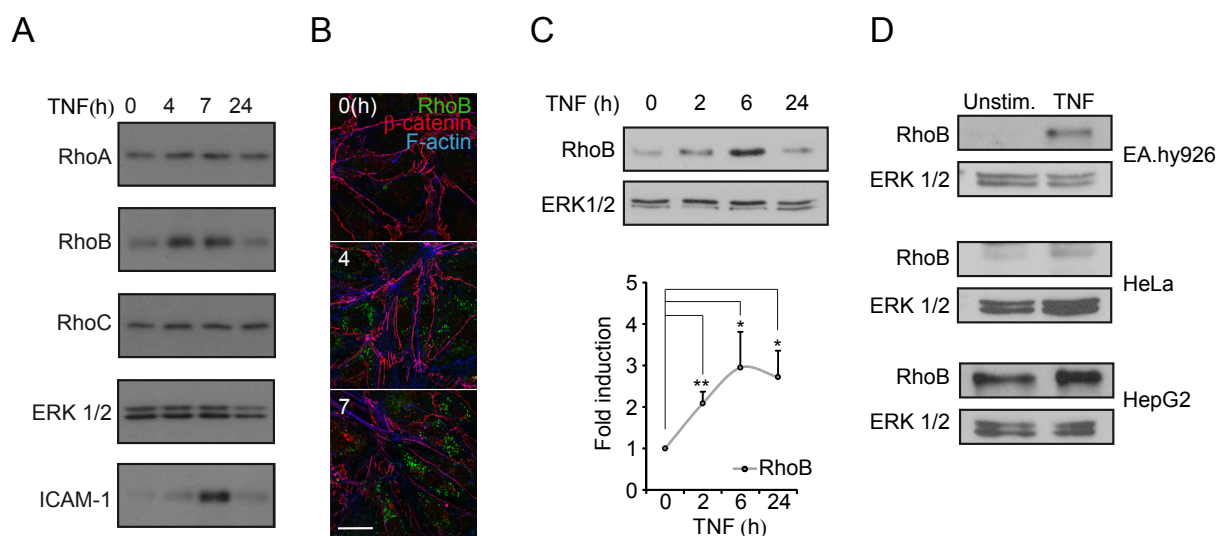


Figura 2. TNF aumenta la expresión de RhoB en otras células endoteliales humanas (A) Las HDMEC se cultivaron con niveles reducidos de nutrientes durante 12 horas, fueron estimuladas con TNF a los tiempos indicados, lisadas y analizadas por inmunodetección. (B) Las HDMEC fueron estimuladas con TNF a distintos tiempos y teñidas para las proteínas indicadas. Barra de escala, 20 μ m. (C) Las HBMEC se cultivaron con niveles reducidos de nutrientes durante 12h, se estimularon con TNF y se lisaron. Se analizaron por inmunodetección para las proteínas indicadas. (D) Células Ea.hy926, HeLa and HepG2 no estimuladas o estimuladas con TNF durante 7 horas se lisaron y se analizaron para la expresión de RhoB por inmunodetección.

La inmunodetección de células HUVECs estimuladas a distintos tiempos con otra citoquina inflamatoria, IL-1 β , reveló que RhoB alcanza un máximo incremento de expresión de tres veces con respecto a células no estimuladas en torno a las 6 horas post-estimulación, manteniéndose elevada hasta las 24 horas post-estimulación. IL-1 β induce un leve aumento en la expresión de RhoA, mientras que no varía la expresión de RhoC (Fig. 3A, B).

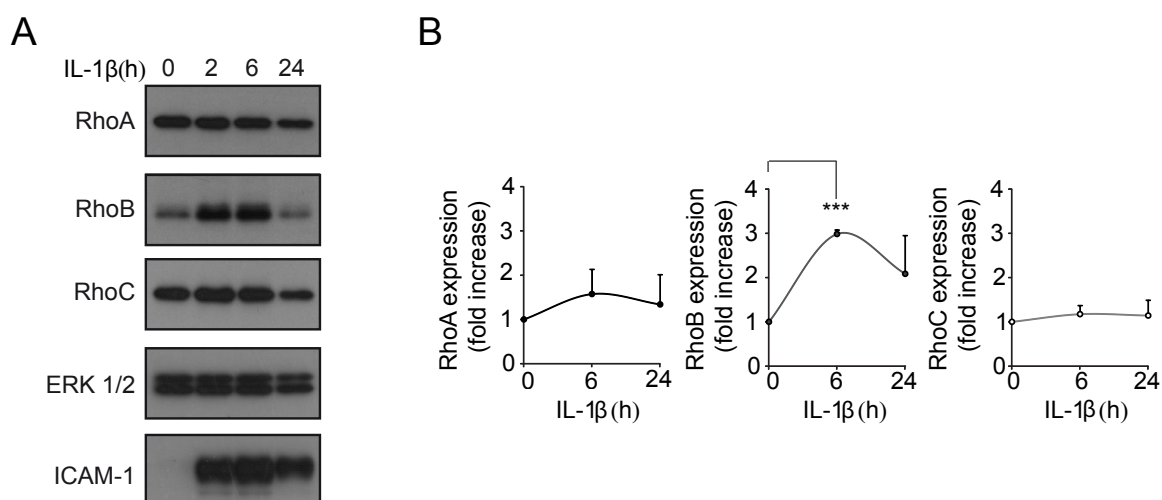


Figura 3. IL-1 β aumenta la expresión de RhoB en células endoteliales humanas. (A) Las células HUVECs cultivaron con niveles reducidos de nutrientes durante 12 horas, se estimularon con IL-1 β a distintos tiempos, se lisaron y se analizaron por *western-blot* con los anticuerpos indicados. (B) Los gráficos muestran la cuantificación de los cambios de expresión de RhoA, RhoB y RhoC en respuesta a IL-1 β como la media + SEM de tres experimentos distintos e independientes. ***, p-valor < 0.001.

1.2. La expresión de RhoB está incrementada en el endotelio de muestras de tejidos de pacientes con enfermedad de Crohn y en los sinusoides hepáticos

Una vez caracterizado el aumento de expresión de RhoB *in vitro*, quisimos estudiar si la expresión de esta proteína se encontraba incrementada en muestras de tejidos humanos inflamados. El análisis de la expresión de RhoB por inmunohistoquímica en el endotelio de la vena de cordones umbilicales humanos usados como control reveló una tinción débil (Fig. 4A), lo que está en consonancia con los resultados del análisis *in vitro* de la expresión de RhoB en células HUVECs no estimuladas. En muestras de intestino delgado sano la tinción de RhoB se observó en células dispersas, probablemente células inmunes, pero no en el endotelio de los vasos sanguíneos (Fig. 4B, C). Sin embargo, el análisis de muestras de intestino delgado y colon de pacientes de enfermedad de Crohn mostró tinción de RhoB en el endotelio de vasos sanguíneos localizados en las proximidades de las fisuras, las zonas más inflamadas y dañadas, apareciendo las zonas adyacentes con tinción de RhoB negativa (Fig. 4E-F). También se detectó un incremento en la expresión de RhoB en los vasos sanguíneos de un ganglio inflamado cerca de una lesión tumoral (Fig. 5A, B).

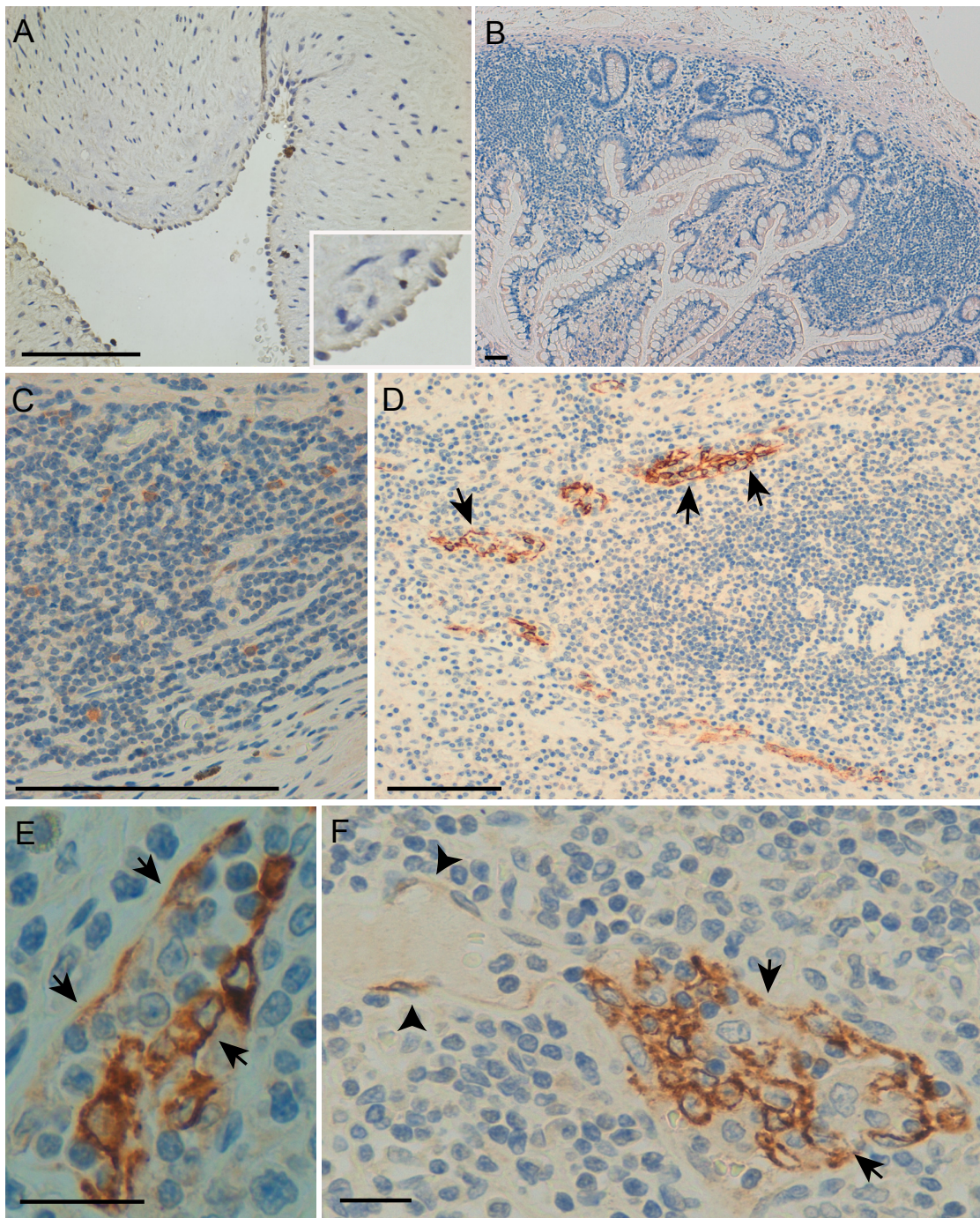


Figura 4. RhoB se expresa en vasos del intestino de pacientes de Enfermedad de Crohn. (A) Tinción débil de RhoB en la vena de cordón umbilical humano. (B, C) Porción Yeyuno de un intestino delgado control muestra la ausencia de reactividad para RhoB excepto en algunas células dispersas parenquimales. (D-F) Intestino delgado de un paciente de Enfermedad de Crohn muestra tinción intensa de RhoB (flechas) en vasos inflamados que contienen altos niveles de células inmunes adheridas. F muestra tinción diferencial de RhoB en vasos con altos niveles de linfocitos adheridos e hiperplasia capilar (cabezas de flecha) con respecto a vasos sin células inmunes (flechas). Barras de escala, A-D 100 μ m, E-F 10 μ m.

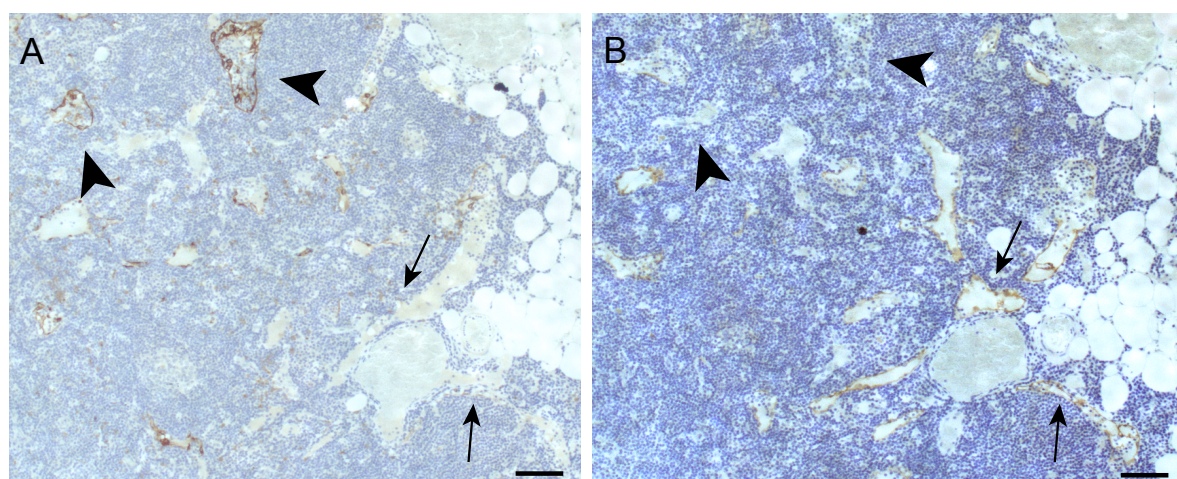


Figura 5. RhoB se expresa en ganglios inflamados cercanos a una lesión tumoral. Secciones consecutivas de un ganglio embebido en parafina procedente de una resección de una tumoración de colon. Se muestra la tinción para RhoB (A) y para el marcador de vasos linfáticos podoplanina (B). Nótese que RhoB se expresa preferencialmente en vasos negativos para podoplanina (cabezas de flecha), mientras que la expresión de RhoB en los vasos positivos para podoplanina (flechas) es menos intensa o negativa. Barras de escala, 100 μ m.

El parénquima hepático es irrigado por vasos que presentan una gran permeabilidad llamados sinusoides. Observamos una tinción claramente positiva para RhoB en el endotelio sinusoidal de muestras de hígados humanos rechazados o en estados avanzados de hepatitis B infecciosa, aunque también en muestras de hígado de donantes sanos (Fig. 6A, B).

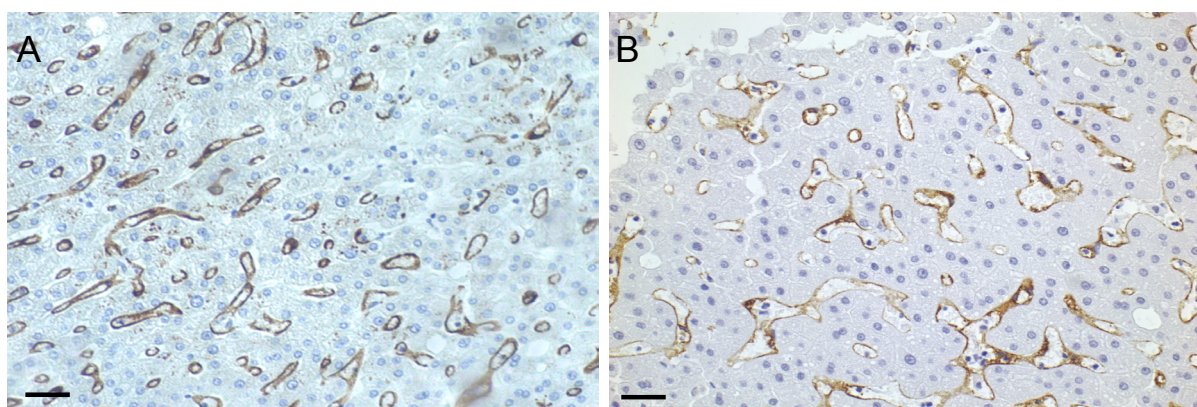


Figura 6. RhoB se expresa en los sinusoides hepáticos. (A, B) Tinción de RhoB en sinusoides de un hígado control (A) y de un hígado infectado por el virus de la Hepatitis B (B). Barras de escala, 100 μ m.

1.3. TNF regula la transcripción del gen de RhoB por la ruta de señalización NF- κ B

Con el objetivo de estudiar si el aumento en la expresión de RhoB era debido a un aumento en la transcripción del gen que codifica para esta proteína, se llevaron a cabo experimentos de PCR cuantitativa a partir de mRNA extraído de HUVECs no estimuladas o estimuladas con TNF durante 4 o 24 horas. Los análisis por PCR cuantitativa revelaron un aumento

en los niveles de mRNA de RhoB de 4 veces, mientras que no se encontró aumento de los mRNA de RhoA o RhoC (Fig. 7A), indicando que el aumento de expresión de RhoB inducido por TNF se debe a cambios en la expresión génica o en la estabilidad del mRNA. TNF dispara en el interior de las células endoteliales dos grandes rutas de señalización que inducen cambios transcripcionales: una mediada por NF- κ B y otra por las quinasas MAPK-JNK. Usando una batería de inhibidores en células HUVECs estimuladas con TNF durante 7 horas, se comprobó que el aumento en la expresión de RhoB se veía reducido o completamente bloqueado en aquellos pocillos donde se había bloqueado la ruta NF- κ B (Fig. 7B), lo que demuestra que TNF dispara la expresión de RhoB a través de esta cascada de señalización.

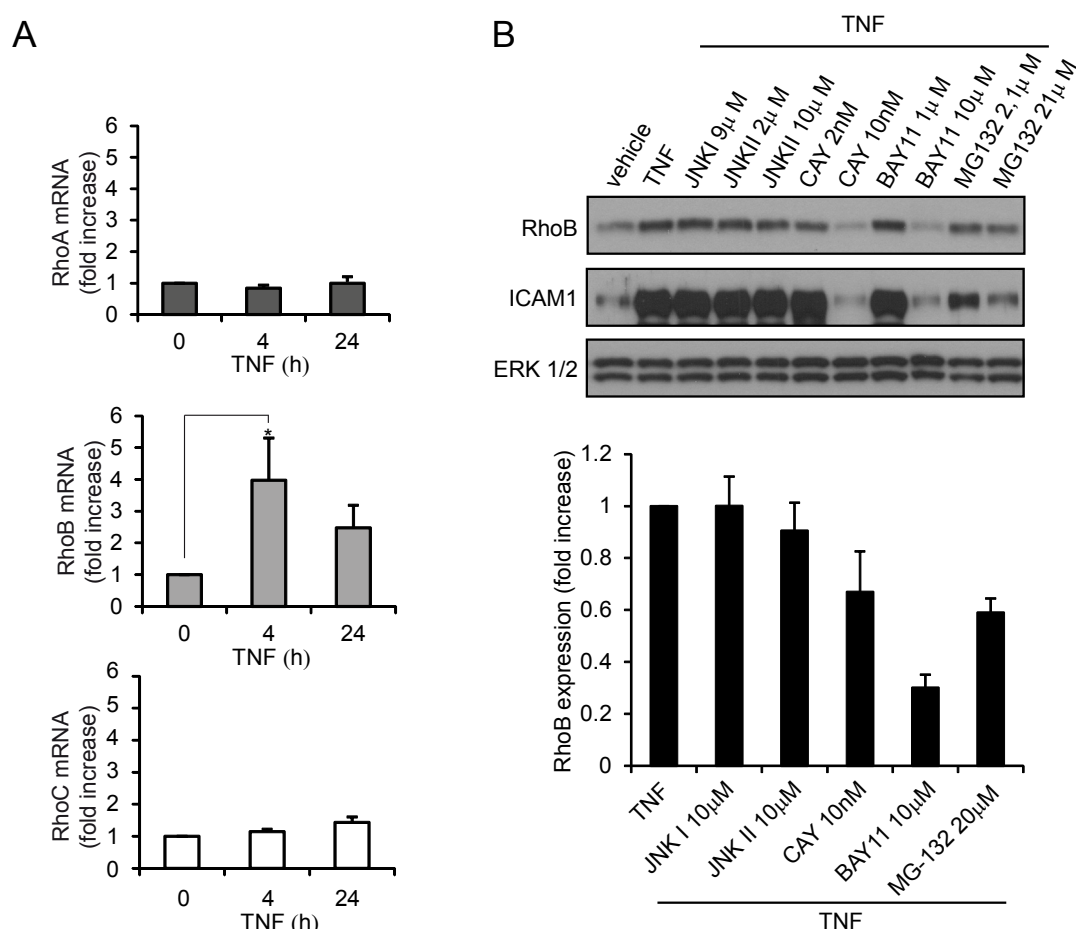


Figura 7. TNF regula la transcripción del gen de RhoB por la ruta de señalización NF- κ B. (A) HUVECs fueron estimuladas con TNF a diferentes tiempos, se aisló el RNA y los transcritos de RhoA, RhoB y RhoC fueron analizados por PCR cuantitativa. Los resultados se normalizaron en función del ARN mensajero de genes constitutivos como β -actina y GADPH. Los gráficos representan la media + error estándar de cuatro experimentos distintos. *, p-valor= 0.022. (B) Células HUVECs se estimularon con TNF durante 7 horas cuando se indica en presencia o ausencia de los inhibidores señalados. Las células fueron lisadas y analizadas por inmunodetección para las proteínas indicadas. El gráfico inferior muestra la cuantificación de la expresión de RhoB y representa la media + error estándar de tres experimentos diferentes.

1.4. RhoA, RhoB y RhoC se expresan en la misma proporción en células HUVECs estimuladas con TNF

RhoA, RhoB y RhoC constituyen una subfamilia dentro de las Rho GTPasas al compartir el 85% de sus secuencias aminoacídicas (Wheeler y Ridley 2004). Para analizar la relevancia del aumento de expresión de RhoB inducido por TNF, cuantificamos los niveles relativos de expresión de RhoA, RhoB y RhoC en células HUVECs estimuladas con TNF durante 7 horas. Debido a la distinta especificidad de cada anticuerpo por su epítipo diana, no es posible comparar los niveles de expresión entre sí de distintas proteínas detectadas con distintos anticuerpos. Para solucionar este problema, se aprovechó el hecho de que disponíamos de una construcción para cada Rho unida al mismo epítipo (myc) y que por lo tanto podían ser detectadas con un anticuerpo común a las tres (anti-myc) y el anticuerpo específico de cada una (anti-RhoA, anti-RhoB o anti-RhoC). De esta forma, se generaron tres lisados independientes de células HEK293T que habían sido previamente transfectados con construcciones que expresan RhoA, RhoB o RhoC unidos al epítipo myc. Por *western blot* se ajustaron las cantidades a cargar de cada lisado para tener niveles comparables de cada Rho-myc, detectados con el anticuerpo anti-myc, y de este modo se generaron los tres lisados patrón. A continuación, se realizaron varios *western blot* en los que se cargaron los lisados patrón en paralelo con muestras de HUVECs, estimuladas o no con TNF. Se utilizaron entonces anticuerpos primarios específicos dirigidos contra cada una de las Rho para detectar simultáneamente las proteínas Rho-myc en los lisados patrón y las proteínas Rho endógenas correspondientes en los lisados de células endoteliales. La señal para cada proteína Rho endógena se normalizó con la señal obtenida en los lisados patrón, con lo que se pudieron cuantificar los niveles relativos de cada una de las tres GTPasas endógenas en HUVECs estimuladas con TNF.

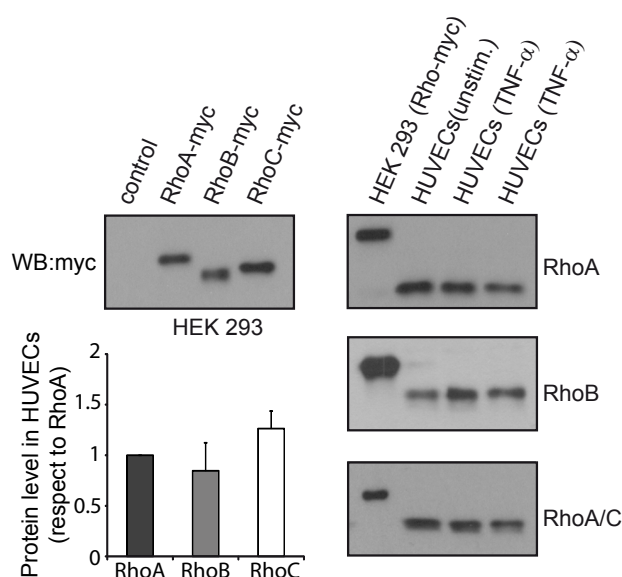


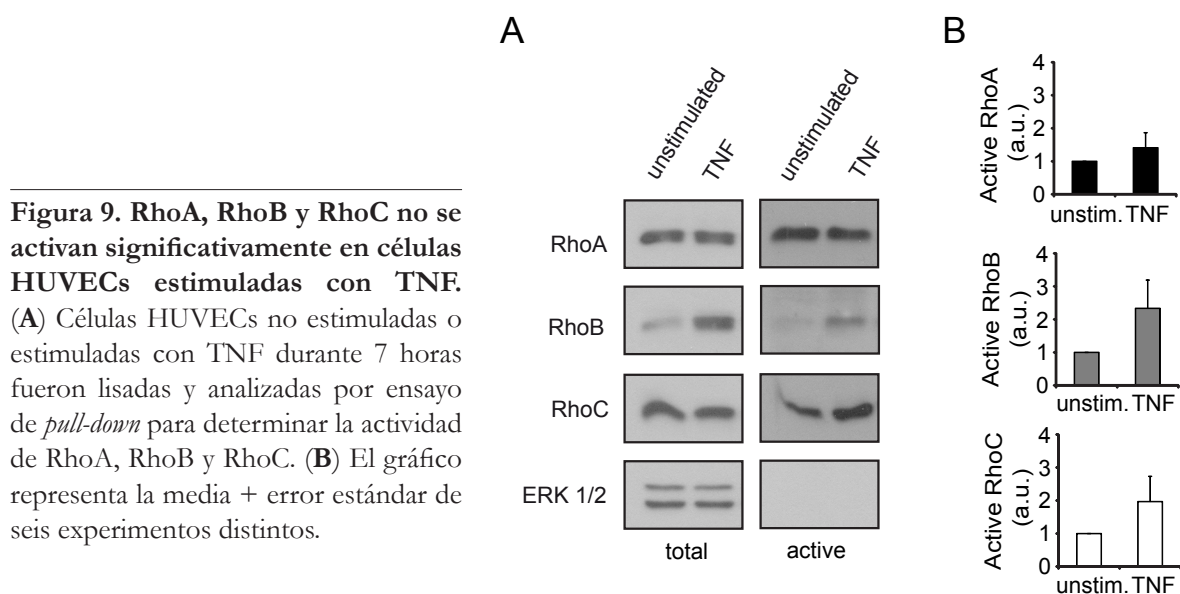
Figura 8. Niveles de expresión relativos de RhoA, RhoB y RhoC en células endoteliales humanas. Se generaron tres lisados diferentes de células HEK 293 que contienen niveles similares de las proteínas exógenas RhoA, RhoB y RhoC unidas a myc y que se emplean como controles internos (panel de la izquierda). Un lisado de células HUVECs no estimuladas y dos lisados de HUVECs estimuladas con TNF junto con los lisados de HEK 293 se analizaron por *Western-blot* con anticuerpos frente a RhoA, RhoB y RhoC (paneles de la derecha). Los niveles de expresión de cada Rho endógena en los lisados correspondientes a la estimulación con TNF fueron normalizados en función de la intensidad de la señal de su correspondiente lisado estándar de HEK. El gráfico inferior representa la abundancia relativa de RhoB y RhoC respecto de la expresión de RhoA. Muestra la media + error estándar de seis lisados diferentes de HUVECs estimuladas con TNF.

Esta cuantificación relativa reveló que en células HUVECs estimuladas con TNF, los niveles de expresión de RhoB son similares o ligeramente menores a los de RhoA y RhoC, por lo que dedujimos que la proteína se expresa a niveles bajos en ausencia de estímulos

inflamatorios, y en respuesta a estos incrementa su expresión a niveles similares a los de RhoA y RhoC (Fig. 8).

1.5. RhoA, RhoB y RhoC se activan de forma similar en células HUVECs estimuladas con TNF

La mayoría de las Rho GTPasas se caracterizan por ciclar entre un estado inactivo, unido a GDP y un estado activo, unido a GTP en el que son capaces de activar a sus proteínas efectoras (A. J. Ridley 2001). Para comprobar si TNF era capaz de inducir la activación de las tres proteínas de la subfamilia Rho, se realizaron ensayos de *pull-down* en células HUVECs que habían sido previamente estimuladas con TNF durante 7 horas.



La citoquina no indujo un aumento en la unión a GTP de RhoA en comparación con células no estimuladas, mientras que indujo la activación de RhoB y RhoC de manera moderada y no significativa (Fig. 9).

2. La subfamilia RhoA presenta funciones aditivas y redundantes en el mantenimiento de la función de barrera

La función de la subfamilia RhoA en el mantenimiento de la función de barrera del endotelio ha sido estudiada previamente, pero siempre inhibiendo al conjunto de la subfamilia o a los efectores comunes de esta (Carbajal y Schaeffer 1999; van Nieuw Amerongen, Vermeer, y van Hinsbergh 2000; P. Wang et al. 2001). Por ello, nos planteamos como objetivo, estudiar la contribución individual de RhoA, RhoB y RhoC al mantenimiento de la barrera endotelial y, a la vez, estudiar si el aumento en la expresión de RhoB mediado por TNF tenía relevancia en alguna de las propiedades de barrera del endotelio vascular inflamado. Los resultados de este rastreo funcional se resumen en la Tabla I.

	Análisis/ARN interferente	RhoA	RhoB	RhoC	RhoA/B/C
HUVECs no estimuladas	Función de barrera basal	-	-/+	++	+++
	Niveles de F-actina	-	-	-	+++
HUVECs estimuladas con TNF	Disfunción de la función de barrera	-	-	-	sin determinar
	Incremento en los niveles de F-actina	-	-	-	+++
	Migración transendotelial de linfocitos	-	-	-	-
	Contracción aguda	-/+	+	-	+++
	Recuperación de la función de barrera tras la contracción	-	+++	-	+++

Tabla I. Análisis funcional del efecto del siRNA contra RhoA, RhoB y RhoC en las propiedades de la barrera endotelial humana.

2.1. Papel de RhoA, RhoB y RhoC en el mantenimiento de la función de barrera endotelial y en la regulación de la polimerización de actina en condiciones de reposo

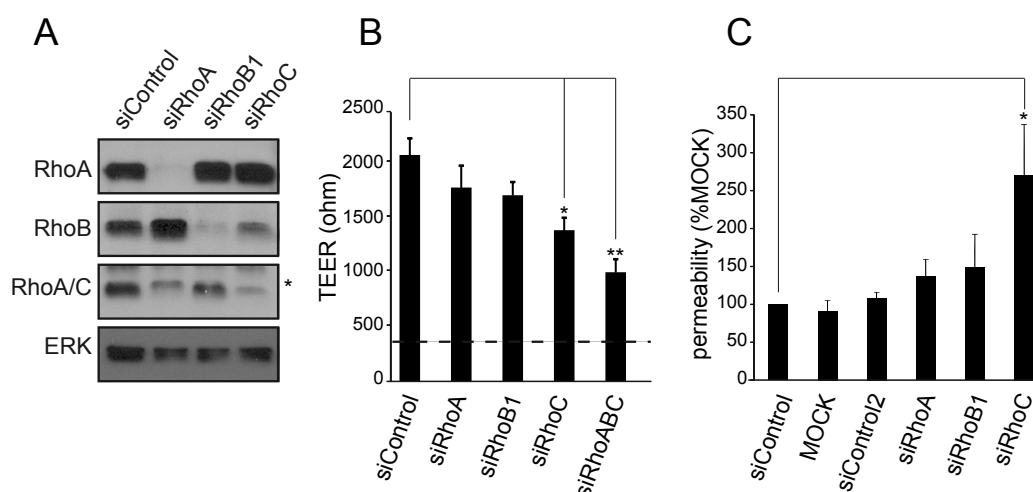


Figura 10. RhoA, RhoB y RhoC desempeñan papeles aditivos en el mantenimiento de la función de barrera (A) Células HUVECs fueron transfectadas en paralelo con un siRNA control (siControl) o dirigido contra RhoA, RhoB o RhoC (siRho). A las 72 horas de la transfección, cuando el siRNA muestra su máxima eficacia, las células fueron lisadas y analizadas por inmunodetección para las proteínas indicadas. El peso molecular relativo de RhoA y RhoC es distinto, por lo que RhoC pudo ser identificado con un anticuerpo que detecta ambas proteínas (anti-RhoA/C, RhoC se corresponde con la banda superior, asterisco). ERK 1/2 se usa como control de carga. (B) La TEER de células HUVECs no estimuladas y tratadas con los siRNA indicados fue determinada mediante el ECIS. El gráfico representa la media + error estándar de cinco experimentos diferentes. *, p-valor= 0.003; **, p-valor=0.001. El triple silenciamiento de Rho dio como resultado valores de resistencia cercanos a los detectados en el pocillo vacío en ausencia de células (línea discontinua), indicando una disrupción total de la integridad de la monocapa. (C) Ensayos de permeabilidad a FITC-dextrano en HUVECs previamente transfectadas con los siRNAs indicados y sembrados en *transwells* durante 48 horas. El gráfico representa la media + error estándar de tres experimentos diferentes. *, p valor <0.05.

Para investigar la función específica de RhoA, RhoB y RhoC, se utilizaron siRNAs para reducir los niveles de expresión de cada una de las tres proteínas, con una eficacia de entre un 60 y un 80% (Fig. 10A). La medición de la función de barrera endotelial se realizó en tiempo real determinando la resistencia eléctrica transendotelial (TEER) a través del sensor de la impedancia eléctrica del sustrato celular (ECIS) y por ensayos de permeabilidad a dextrano fluorescente en células sembradas en *transwell*. Mientras que el silenciamiento de RhoA y RhoB en células HUVECs tuvo un efecto menor en la permeabilidad basal del endotelio, en cambio el silenciamiento de RhoC redujo notablemente la TEER y aumentó la permeabilidad al paso de pequeñas moléculas (Fig. 10B y 10C). Además, el silenciamiento triple de RhoA, RhoB y RhoC redujo drásticamente y en mayor medida que el individual la TEER (Fig. 10B). Por otro lado, la reducción individual de cada proteína no afectó al contenido de actina filamentosa, mientras que el silenciamiento simultáneo de las tres redujo drásticamente la actina polimerizada (Fig. 11).

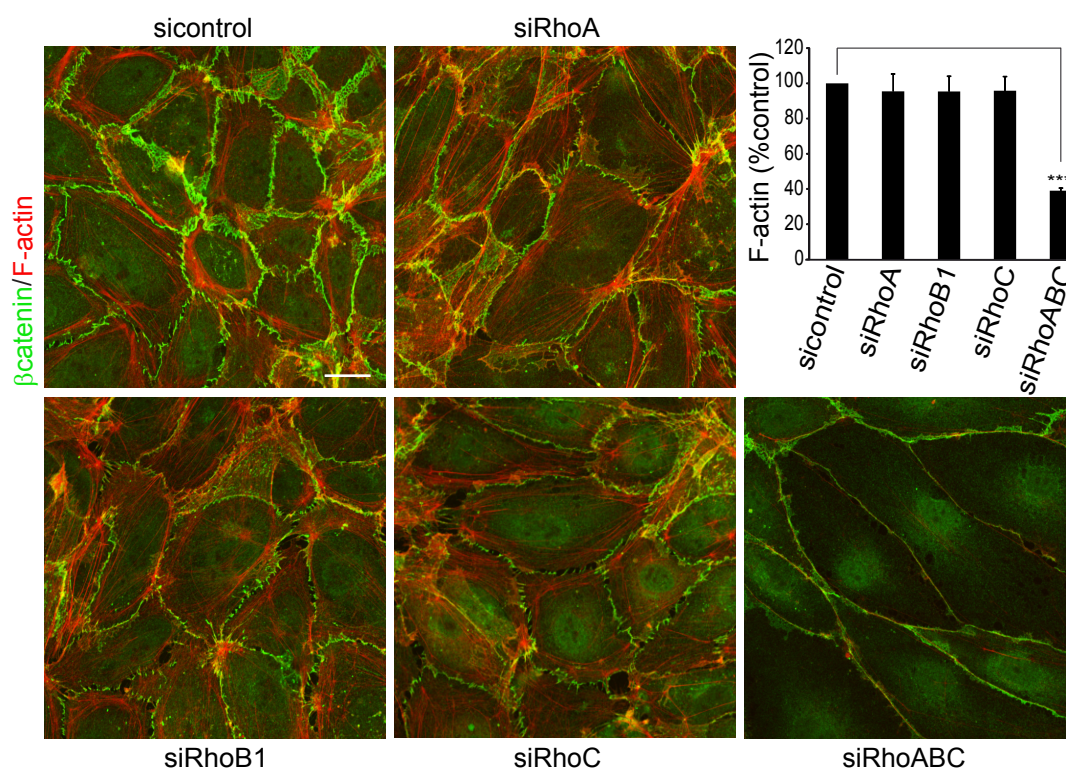


Figura 11. RhoA, RhoB y RhoC desempeñan papeles redundantes en la regulación de la polimerización de actina en condiciones de reposo. Células HUVECs transfectadas con los siRNAs indicados se fijaron y tiñieron para la actina filamentosa y el componente de las uniones adherentes β -catenina. Barra de escala= 20 μ m. El gráfico de la esquina superior derecha muestra la cuantificación de la intensidad de la actina filamentosa por célula, representada como la media + error estándar de cinco experimentos diferentes. ***, p-valor 2.19×10^{-6} .

A la vista de estos resultados, concluimos que RhoA, RhoB y RhoC se compensan entre ellas o, en otras palabras, desempeñan papeles redundantes en la regulación de la polimerización de actina, mientras que su papel en el mantenimiento de la barrera endotelial en células en reposo parece ser aditiva, aunque en este último caso RhoC parece ser funcionalmente predominante.

2.2. Función de RhoA, RhoB y RhoC endotelial en la alteración de la función de barrera y la polimerización de actina en respuesta a TNF

A continuación, analizamos la función de la subfamilia RhoA en el aumento de la permeabilidad endotelial inducido por TNF. El silenciamiento individual de cada Rho no inhibió significativamente la reducción de la TEER, determinado a través de ensayos de ECIS (Fig. 12A, B) o de permeabilidad en *transwells* (Fig. 12C).

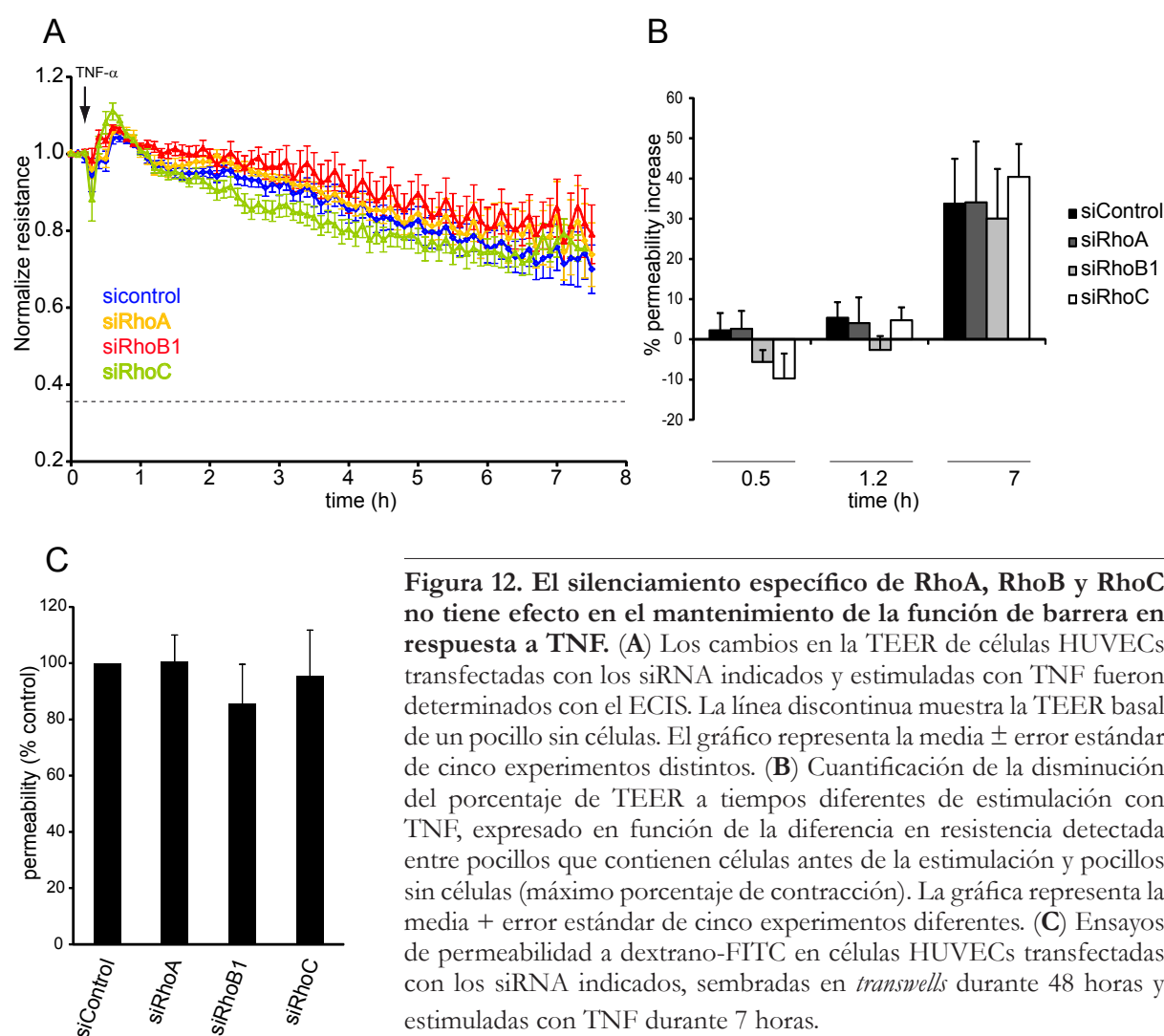


Figura 12. El silenciamiento específico de RhoA, RhoB y RhoC no tiene efecto en el mantenimiento de la función de barrera en respuesta a TNF. (A) Los cambios en la TEER de células HUVECs transfectadas con los siRNA indicados y estimuladas con TNF fueron determinados con el ECIS. La línea discontinua muestra la TEER basal de un pocillo sin células. El gráfico representa la media \pm error estándar de cinco experimentos distintos. (B) Cuantificación de la disminución del porcentaje de TEER a tiempos diferentes de estimulación con TNF, expresado en función de la diferencia en resistencia detectada entre pocillos que contienen células antes de la estimulación y pocillos sin células (máximo porcentaje de contracción). La gráfica representa la media \pm error estándar de cinco experimentos diferentes. (C) Ensayos de permeabilidad a dextrano-FITC en células HUVECs transfectadas con los siRNA indicados, sembradas en *transwells* durante 48 horas y estimuladas con TNF durante 7 horas.

Dado que el triple silenciamiento afectó drásticamente a la función de barrera endotelial en células en reposo, su efecto sobre la reducción de la permeabilidad en respuesta a TNF no pudo ser determinado. De manera similar a como ocurría en células no estimuladas, el silenciamiento individual de cada proteína Rho no afectó al contenido de actina filamentosa tras la estimulación con TNF (Fig. 13). En cualquier caso, datos previos en nuestro laboratorio indican que la inhibición del efector común a las tres proteínas ROCK no tiene efecto sobre el aumento de permeabilidad mediado por TNF (Fernández-Martín et al. 2012), lo que concuerda con el efecto menor en este proceso observado al silenciar de manera individual cada proteína.

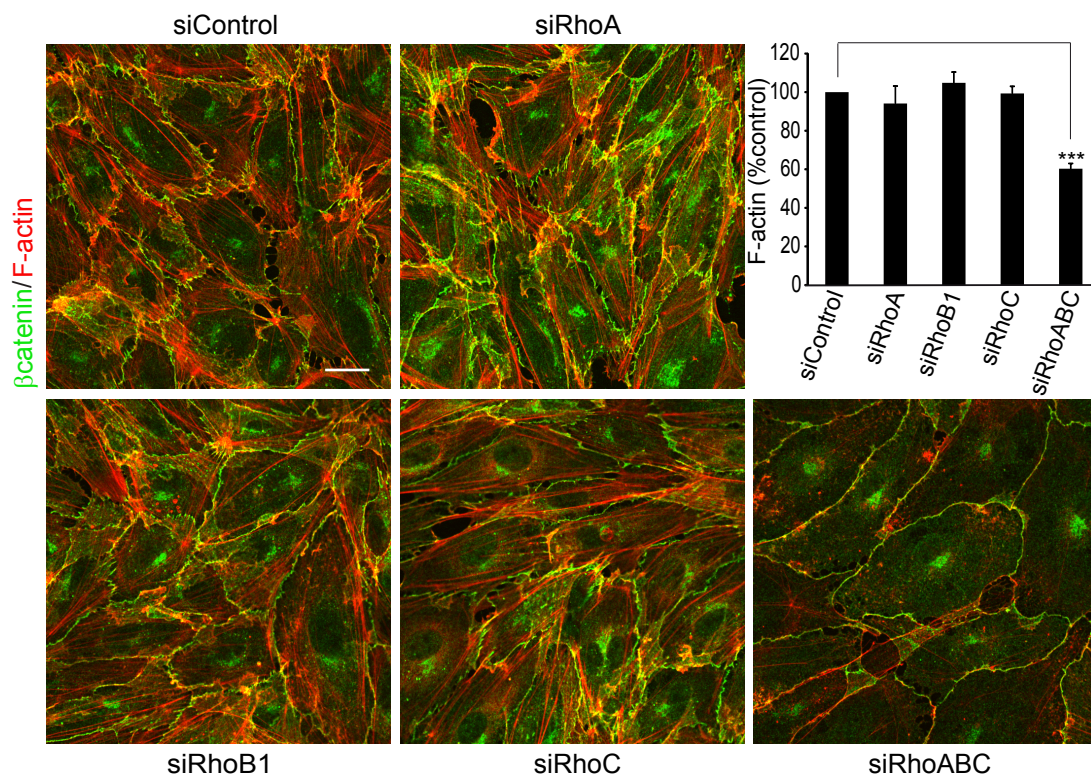


Figura 13. RhoA, RhoB y RhoC desempeñan papeles redundantes en la regulación de la polimerización de actina en células estimuladas con TNF. Cambios en la intensidad de la tinción de actina filamentosa en células HUVECs transfectadas con siRNA y estimuladas con TNF durante 7 horas. Barra de escala= 20μm. El gráfico de la esquina superior derecha muestra la cuantificación de la intensidad de la actina filamentosa por célula, representada como la media + error estándar de tres experimento diferentes. **, p-valor 4×10^{-4} .

2.3. El silenciamiento de RhoA, RhoB y RhoC no tiene efecto en la trans migración de leucocitos a través del endotelio

TNF aumenta la trans migración de leucocitos a través de la barrera endotelial (May y Ager 1992).

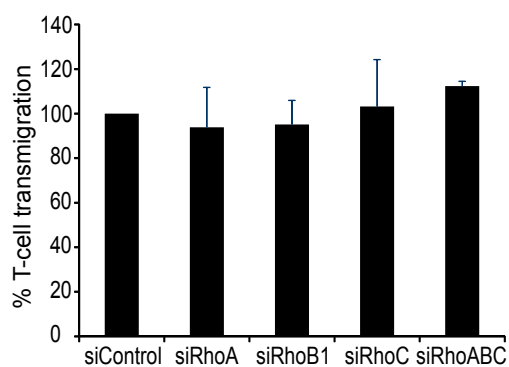


Figura 14. El silenciamiento de RhoA, RhoB y RhoC no tiene efecto en la trans migración de linfocitos a través del endotelio. Células HUVECs se transfectaron con los siRNAs indicados, a las 24 horas post-transfección se sembraron en *transwells* con un tamaño de poro de 3 μm durante 48 horas y se estimularon con TNF durante 7 horas. Se añadieron PBLs marcados con calceína en la cámara superior de los *transwells* y se dejaron trans migrar durante 4 horas. Los linfocitos trans migrados fueron determinados mediante la medición de la fluorescencia emitida por la calceína presente en la cámara inferior con un lector de fluorescencia de placas. El gráfico representa la media + error estándar de tres experimentos diferentes.

Para comprobar si RhoA, RhoB o RhoC son relevantes en este proceso, realizamos ensayos de trans migración en *transwell* con un tamaño de poro mayor usando células HUVECs previamente silenciadas para cada proteína de manera individual o simultánea y linfocitos humanos de sangre periférica extraídos de donantes. No observamos cambios en la trans migración de leucocitos a través de células endoteliales que habían sido silenciadas para cada proteína individualmente ni tampoco en aquellas en las que la expresión de las tres proteínas había sido reducida de manera simultánea (Fig. 14). A pesar de estos resultados, dado que la subfamilia de las Rho GTPasas ha sido propuesta como un mediador importante de la remodelación endotelial tras la interacción leucocito-endotelio (Reglero-Real, Marcos-Ramiro, y Millán 2012), no se debe descartar un posible efecto de estas proteínas en ensayos de trans migración *in vivo* más sofisticados que los aquí realizados.

3. RhoB regula específicamente la recuperación de la barrera endotelial tras una contracción protrombótica aguda

Durante la respuesta inflamatoria, se produce disfunción endotelial que en combinación con la acción de las citoquinas proinflamatorias liberadas por las células del sistema inmune promueve la contracción aguda del endotelio que puede afectar a la integridad endotelial. La trombina generada en el torrente circulatorio es un paradigma de estos estímulos de contracción aguda. Tras activar a los receptores de la superficie endotelial, la trombina dispara cascadas de señalización intracelulares que culminan con la generación de gruesos cables de actina o fibras de estrés que permiten la contracción celular, median el cambio de morfología y por último el aumento en la permeabilidad agudo con consecuencias potenciales graves para la integridad vascular. Nuestro siguiente objetivo fue testar si RhoA, RhoB o RhoC están implicadas en la contracción endotelial aguda inducida por la proteasa trombina en un contexto inflamatorio.

3.1. Trombina activa a RhoA, RhoB y RhoC

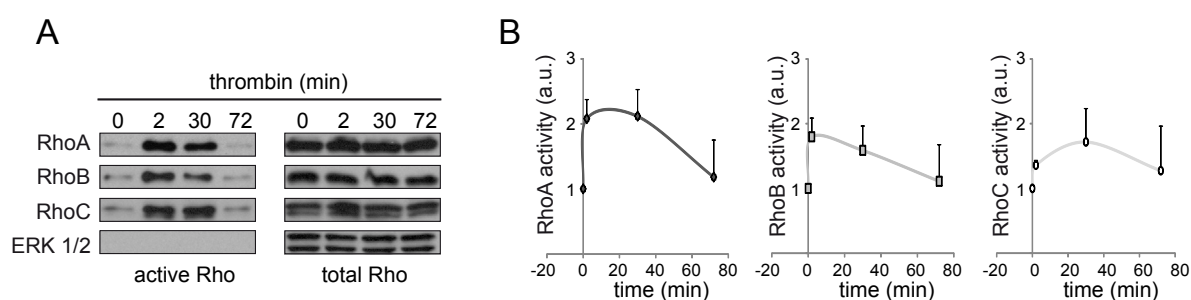


Figura 15. RhoA, RhoB y RhoC se activan en respuesta a trombina. (A) Ensayos de *pull-down* muestran que RhoA, RhoB y RhoC se activan durante la contracción trombótica en HUVECs previamente tratadas con TNF durante 7 horas. (B) Los gráficos muestran la cuantificación de Rho activa normalizada frente a los niveles totales de Rho de tres experimentos independientes.

Para comprobar si la trombina era capaz de inducir la activación de las Rho GTPasas, se realizaron ensayos de *pull-down* en células HUVECs que habían sido previamente estimuladas con TNF durante 7 horas. Los ensayos revelaron que la proteasa induce la activación de los tres miembros de la subfamilia Rho, con cinéticas e intensidades comparables (Fig. 15A, B).

3.2. RhoB, pero no RhoA y RhoC, regula la recuperación de la función de barrera tras la contracción inducida por trombina

Para testar la contribución de cada GTPasa en la contracción protrombótica aguda se utilizó siRNA para silenciar cada proteína independientemente o de manera simultánea y el sistema ECIS para medir la resistencia eléctrica transendotelial. Previamente a la estimulación con trombina, las células HUVECs fueron tratadas con TNF durante 7 horas. La estimulación con trombina indujo una disminución inmediata de la resistencia, lo que se traduce en un aumento brusco de la permeabilidad endotelial, hasta alcanzar un mínimo de resistencia (en torno a los 350 ohm o 0,3 en valores normalizados). Este es el máximo punto de contracción endotelial y se alcanza alrededor de los 25 minutos post-estimulación. Después, las células se recuperan gradualmente de la contracción y la resistencia retorna a los valores previos tras dos horas de estimulación.

Las células tratadas con un siRNA control o uno dirigido contra RhoA o RhoC no presentaron alteración del proceso de contracción protrombótico. Sin embargo, las células silenciadas para RhoB usando dos siRNAs distintos mostraron una disminución leve de la contracción máxima y un acortamiento significativo del tiempo necesario para la recuperación de la barrera endotelial, de tal forma que mientras que las células control alcanzaron los valores iniciales de resistencia a las 2 horas post-estimulación, las células silenciadas para RhoB lo hicieron entre 1 hora y 1 hora y cuarto post-estimulación (Fig. 16A). Por otro lado, y a pesar de que la permeabilidad basal de las células tratadas con los tres siRNAs simultáneamente es menor que para el resto de condiciones, el triple silenciamiento redujo notablemente tanto la contracción inicial como el tiempo necesario para la recuperación de los valores de resistencia iniciales. Esto concuerda con el hecho de que la inhibición del efector común a las tres Rho GTPasas ROCK produce un efecto inhibitorio similar (McKenzie y Ridley 2007; Fernández-Martín et al. 2012).

Los análisis por inmunofluorescencia de células tratadas con los diferentes siRNAs, estimuladas y teñidas para actina filamentosa y el componente de las uniones intercelulares β -catenina confirmaron que la recuperación de la barrera endotelial se ve acelerada en células silenciadas para RhoB (Fig. 16B).

Estos resultados indican que, mientras que las tres Rho GTPasas tienen un papel redundante en la contracción máxima inducida por trombina, RhoB juega un papel predominante en el mantenimiento del evento de contracción.

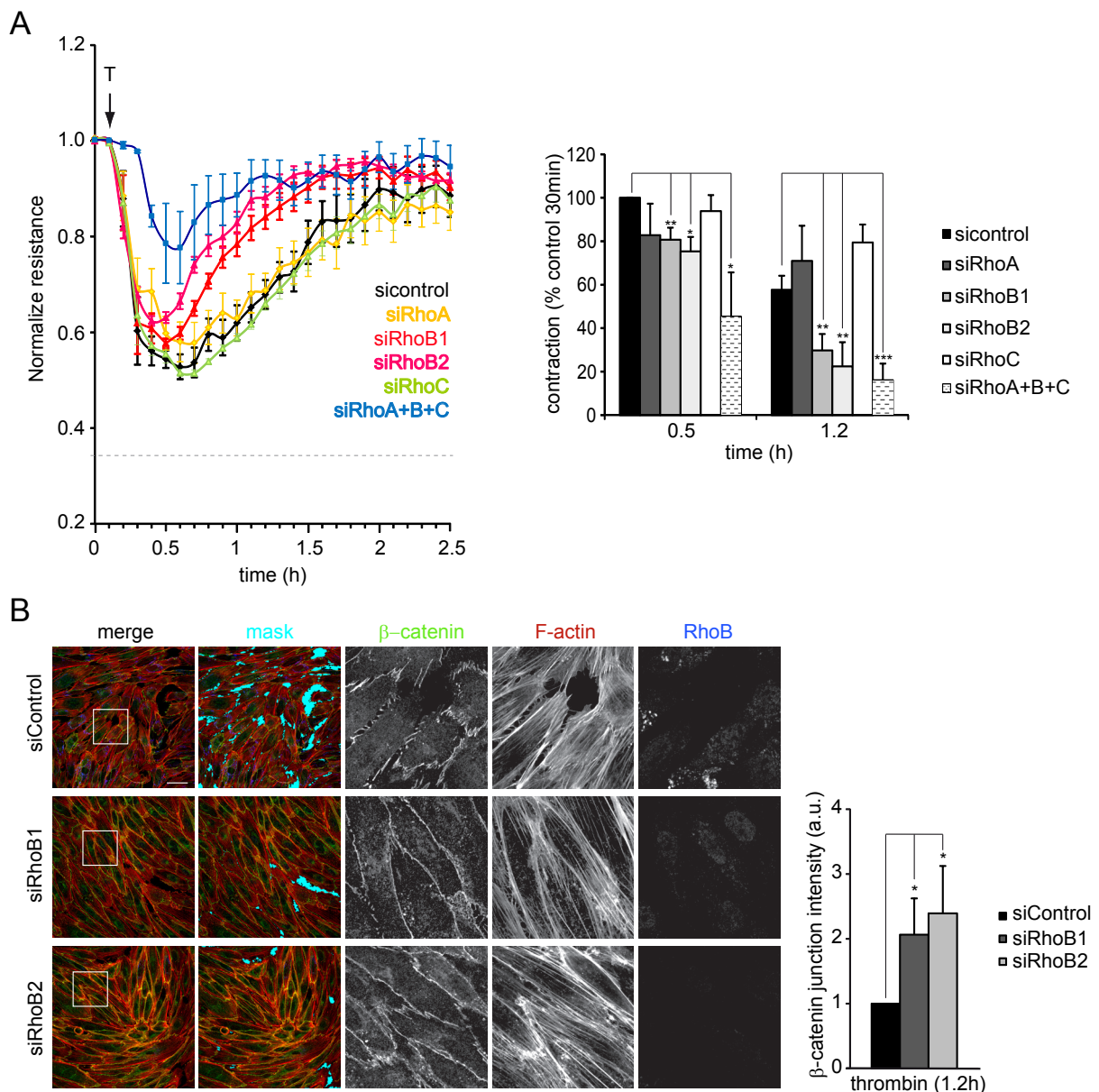


Figura 16. RhoB regula negativamente la recuperación de la barrera endotelial tras la contracción inducida por trombina en células endoteliales humanas inflamadas. (A) Cambios en la TEER de la monocapa endotelial durante la contracción protrombótica de células previamente transfectadas con siRNA y estimuladas con TNF durante 7 horas. Muestra el promedio \pm SEM de al menos tres experimentos distintos. La gráfica muestra la cuantificación del porcentaje de máxima contracción con respecto a las células tratadas con el siControl en los tiempos indicados, expresada como el promedio + error estándar de al menos tres experimentos independientes. *, p-valor<0.02; **, p-valor<0.007; ***, p-valor=1x10⁻⁴. (B) Las células previamente transfectadas con los siRNAs indicados y estimuladas con TNF durante 7 horas fueron tratadas con trombina durante 72 minutos, fijadas y teñidas para β -catenina y actina filamentosa. Los espacios entre células se identificaron a través del procesamiento automatizado de la imagen con Image J. La tinción de β -catenina en el borde de las células se cuantificó mediante procesamiento semi-automático de la imagen con Image J. La gráfica de la derecha muestra esta cuantificación como el promedio + error estándar de cinco experimentos independientes. *, p-valor<0.046. Barra de escala=20 μ m.

4. RhoB no regula específicamente la señalización que controla las fibras de estrés de actina

El aumento de permeabilidad endotelial inducido por la trombina es una consecuencia de la remodelación del citoesqueleto de actina. La proteasa se une y corta al receptor de la superficie endotelial PAR1, activando cascadas de señalización intracelulares, entre ellas la ruta Rho-ROCK que media la formación de fibras de estrés y aumenta la capacidad de contracción celular por actomiosina (van Nieuw Amerongen et al. 2007). Tras la contracción, las fibras de estrés se anclan al sustrato mediante la interacción de sus extremos a complejos proteicos conocidos como adhesiones focales, que también son regulados por las Rho GTPasas (Chrzanowska-Wodnicka y Burridge 1996). La paxilina actúa como proteína estructural de las adhesiones focales. El extremo N-terminal de la paxilina es rico en sitios de interacción proteína-proteína y permite la interacción de otros componentes de las adhesiones focales como las tirosinas quinasas FAK, Src u otras proteínas estructurales como vinculina (Turner, Glenney, y Burridge 1990). La quinasa FAK ha sido implicada en la reformación de la monocapa endotelial tras la contracción inducida por trombina (Knezevic et al. 2009) y la fosforilación inducida por trombina tanto de paxilina como de FAK es regulada por el efector de las Rho GTPasas PRK1 (Gavard y Gutkind 2008).

Como los niveles de expresión y las cinéticas de activación de RhoA, RhoB y RhoC son similares después de la estimulación con trombina (Fig. 15), el papel específico de RhoB en la contracción podría deberse a una regulación diferencial de la señalización implicada en el proceso.

4.1. RhoA, pero no RhoB, regula la fosforilación de la cadena ligera de la miosina II

Para estudiar la implicación de RhoB en la señalización que regula la formación de las fibras de estrés, se silenció la proteína y se compararon los niveles de fosforilación de la subunidad reguladora de la miosina, MLC, con aquellos en células tratadas con un siRNA control o dirigido contra la GTPasa RhoA. La estimulación con trombina en células tratadas con un siRNA control indujo una fosforilación en Serina-19 a tiempos tempranos, que retornó rápidamente a niveles basales entre 30 y 70 minutos post-estimulación. Mientras que en células silenciadas para RhoB se produjo una mínima reducción de la fosforilación de MLC en comparación con las control, el silenciamiento de RhoA indujo una marcada disminución de la fosforilación en MLC (Fig. 17A, B). Estos resultados apuntan a RhoA como la GTPasa que regula mayoritariamente la vía de señalización ROCK-MLC en células estimuladas con trombina.

4.2. RhoA y RhoB regulan conjuntamente la fosforilación de paxilina

Para estudiar la implicación de RhoB en la señalización que regula la formación de las adhesiones focales, se silenció con siRNA y se compararon los niveles de fosforilación de paxilina con aquellos en células tratadas con un siRNA control o dirigido contra la GTPasa RhoA. La trombina incrementó la fosforilación de la paxilina en Tyrosina-118 entre los 2 y los 70 minutos post-estimulación. El silenciamiento individual de RhoA y RhoB redujo de una forma similar y parcialmente los niveles de fosforilación de la paxilina (fig. 17A, C), indicando una regulación conjunta y no específica de RhoB de la formación de las adhesiones focales.

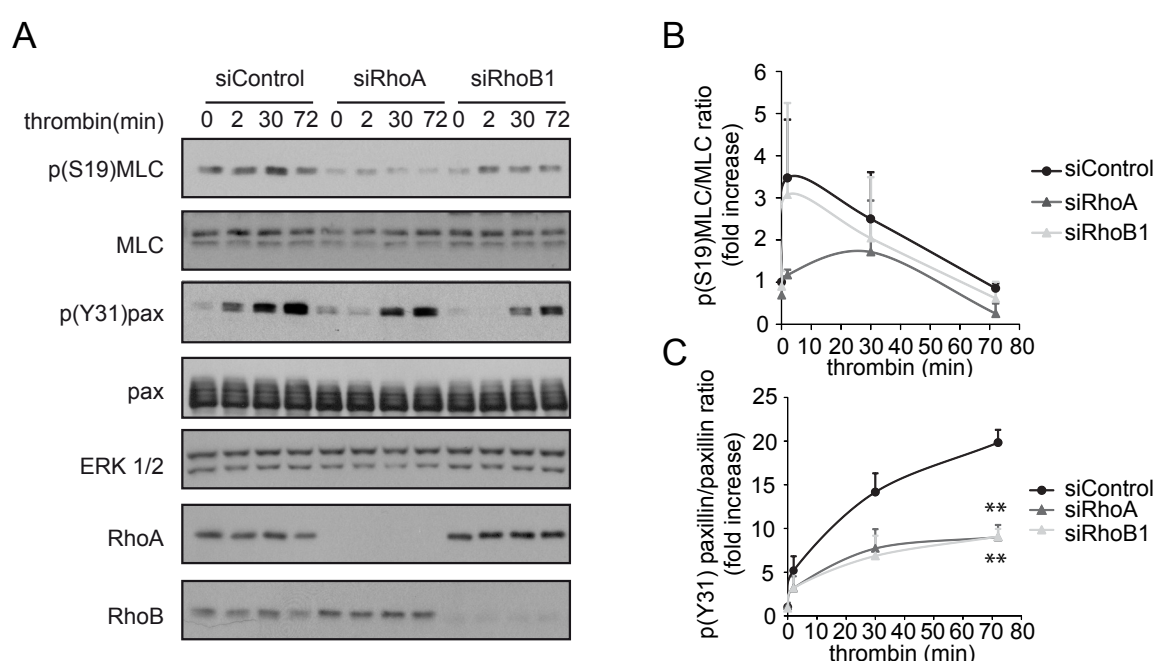


Figura 17. Función de RhoA y RhoB en la fosforilación de MLC y paxilina. (A) Células HUVECs tratadas con siRNA y TNF fueron estimuladas con trombina durante los tiempos indicados, lisadas y analizadas por *western-blot*. (B) El gráfico muestra la cuantificación de la fosforilación de la cadena ligera de la miosina II de al menos tres experimentos independientes, representada como la media + SEM. (C) El gráfico muestra la cuantificación de la fosforilación de la paxilina de al menos tres experimentos independientes, expresada como el promedio + SEM. **, p-value<0.005.

Estos resultados indican que la proteína RhoB no está implicada específicamente en las cascadas de señalización intracelulares desencadenadas por la trombina que median la formación de las fibras de estrés y las adhesiones focales. También sugiere que la inhibición parcial de la fosforilación de MLC no inhibe la contracción inducida por trombina, lo que ha sido corroborado en nuestro laboratorio utilizando inhibidores farmacológicos.

5. RhoB regula negativamente las extensiones de membrana plasmática durante la recuperación de la morfología celular tras la contracción

5.1. RhoB constitutivamente activo no altera las uniones intercelulares

Durante el proceso de contracción, las uniones célula-célula se desorganizan, favoreciendo la aparición de huecos entre las células que explican el rápido incremento en la permeabilidad inducido por trombina. Tras la contracción, es necesaria la reorganización de las uniones intercelulares para recuperar la integridad de la monocapa. Con el objetivo de estudiar si RhoB regula las uniones intercelulares, se transfectaron células con un mutante constitutivamente activo de RhoB (RhoBV14-HA), en el que la glutamina 14 dentro de la región de unión a GTP se ha sustituido por valina (Prendergast et al. 1995).

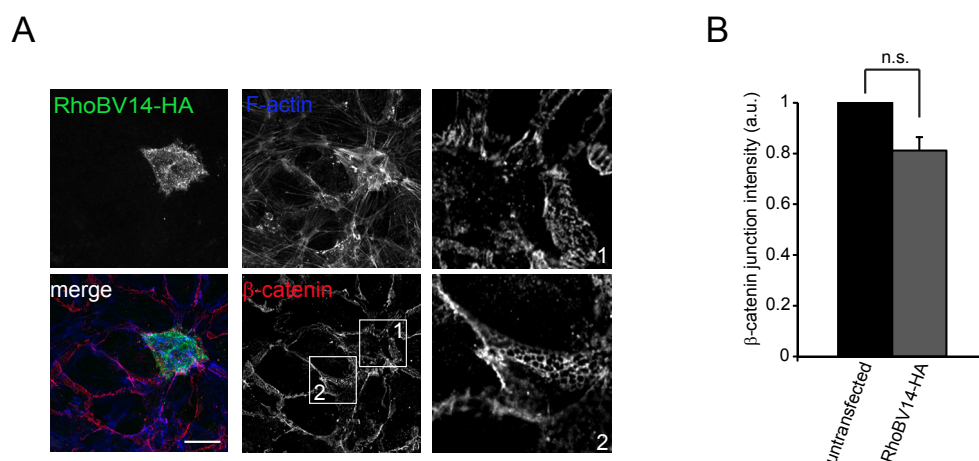


Figura 18. RhoB constitutivamente activo no altera las uniones intercelulares (A) El mutante constitutivamente activo HA-RhoBV14 se transfectó en HUVECs que se dejaron crecer 48 horas hasta alcanzar la confluencia. Las células fueron fijadas y teñidas para las proteínas indicadas. Las imágenes inferiores corresponden a la ampliación de las regiones recuadradas en la imagen superior y muestran la tinción de β -catenina en células transfectadas con HA-RhoBV14 (1) o no transfectadas (2). Barra de escala=20 μ m. **(B)** La gráfica muestra la cuantificación de la tinción de β -catenina en 7 células transfectadas con HA-RhoBV14 frente a células no transfectadas, pertenecientes a dos experimentos distintos y expresada como el promedio \pm SEM. n.s. no significativo.

Las células transfectadas y posteriormente teñidas para el componente de las uniones adherentes β -catenina no presentaron alteraciones significativas de las mismas cuando las comparamos con las uniones de células adyacentes no transfectadas (Fig. 18A, B), sugiriendo que RhoB no regula la formación o el mantenimiento de las uniones célula-célula.

5.2. RhoB regula la extensión de las membranas endoteliales tras la contracción inducida por trombina

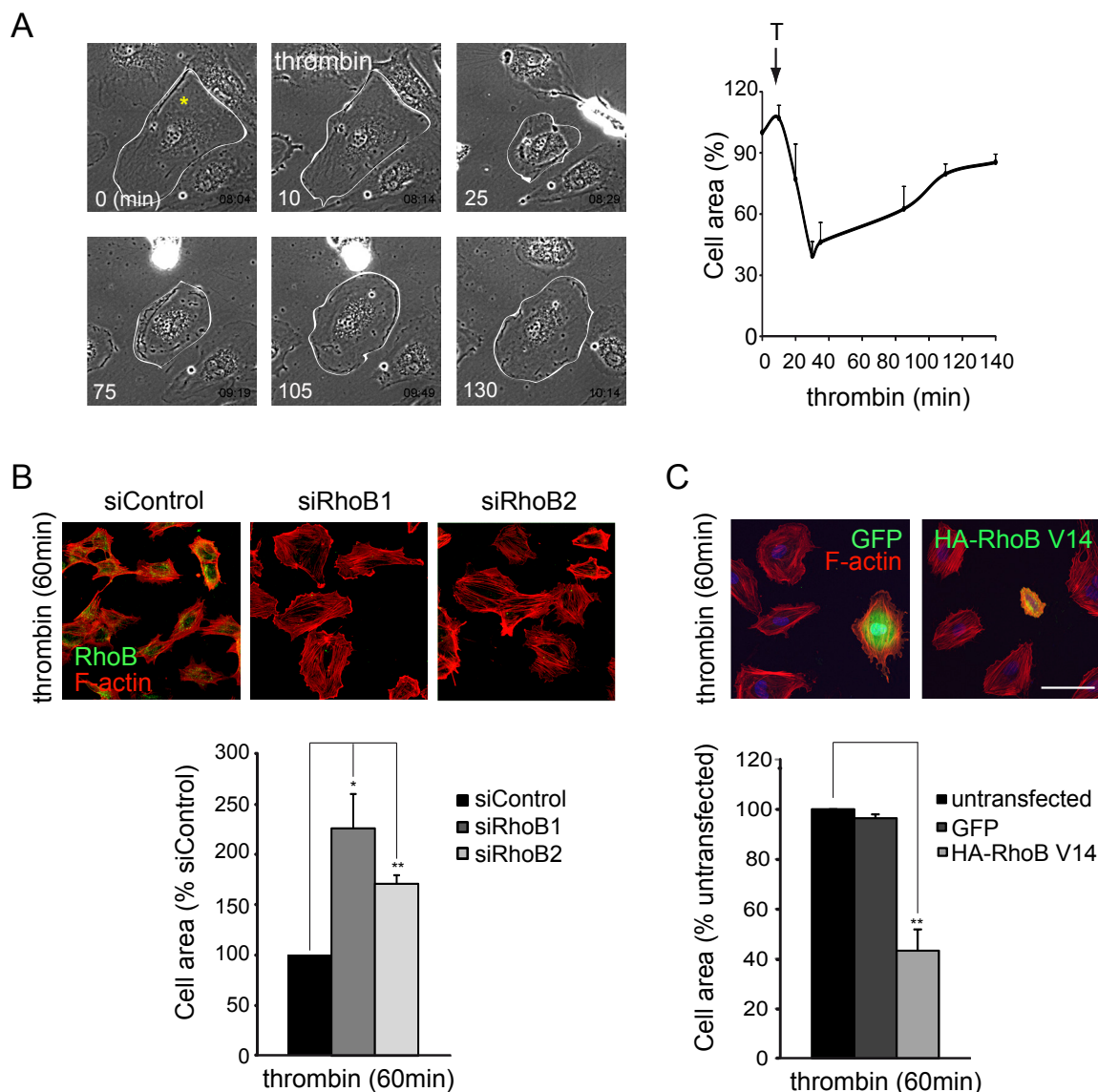


Figura 19. RhoB regula la recuperación del área celular tras la contracción protrombótica. (A) Las dinámicas en la contracción inducida por trombina en HUVECs subconfluentes son comparables a las del endotelio confluyente. Videomicroscopía de células HUVECs subconfluentes estimuladas con trombina. Se muestran imágenes representativas del vídeo donde se puede observar el cambio morfológico en las células inducido por trombina (línea blanca). El gráfico de la derecha representa la cuantificación del área celular a partir de imágenes individuales de los tiempos indicados extraídas de distintos vídeos. (B) Células HUVECs previamente transfectadas con siRNA y tratadas con TNF durante 7 horas fueron estimuladas con trombina durante 60 minutos, fijadas y teñidas para actina filamentosa y RhoB. El gráfico de la derecha cuantifica el área celular, expresada como el promedio + SEM de al menos 5 células por imagen, 10 imágenes por experimento de cuatro experimentos independientes. *, p-valor=0.022; **, p-valor=0.002. (C) HUVECs que expresaron GFP o HA-RhoBV14 durante 24 horas fueron estimuladas con trombina durante 60 minutos, fijadas y teñidas para actina filamentosa y RhoB exógeno con un anticuerpo anti-HA. Se cuantificó el área celular de al menos 10 células por experimento de tres experimentos independientes y se representa en el gráfico inferior como la media + SEM. **, p-valor=0.001.

A la vista de los resultados anteriores, nos preguntamos si el papel de RhoB en la recuperación de la función de barrera podría ser independiente de las uniones intercelulares. Decidimos por lo tanto estudiar el efecto de la trombina y del silenciamiento de RhoB en ausencia de uniones, es decir, en condiciones de subconfluencia. En primer lugar, observamos que los cambios en el área celular como consecuencia de los procesos de contracción y recuperación inducida por trombina en células subconfluentes (vídeo 1 y Fig. 19A) eran consistentes con los cambios en la permeabilidad endotelial que el estímulo induce en la monocapa endotelial (Fig. 16A). Además, la comparación de la cinética de contracción/recuperación de células estimuladas con trombina y tratadas con un siRNA control o silenciadas para RhoB usando dos siRNAs distintos reveló que el área de las células silenciadas para RhoB era notablemente mayor (Fig. 19B). Y al contrario, la sobreexpresión del mutante constitutivamente activo RhoBV14-HA redujo el área de las células subconfluentes al compararlas con células no transfectadas o transfectadas con GFP como control (Fig. 19C). Estos resultados sugieren que RhoB regula negativamente la extensión de la membrana celular y la expansión de la célula endotelial sobre el sustrato que tiene lugar tras la contracción protrombótica y que es necesaria para la reformación de la monocapa endotelial.

6. Trombina modula el tráfico intracelular de RhoB

En el caso de las Rho GTPasas, su localización también determina su actividad. Cuando se encuentran inactivas, las Rho GTPasas se localizan en el citosol unidas a proteínas GDIs, que las mantienen en el estado inactivo. Sin embargo, durante su activación se desanclan de las GDIs y se unen a GEFs, que las cargan con GTP. En este momento es cuando las GTPasas sufren un cambio conformacional y exponen un dominio prenilado que facilita su anclaje a las membranas celulares, desde dónde activan a sus efectores e inician cascadas de señalización. A diferencia de RhoA y RhoC, que se localizan en la membrana plasmática una vez activadas, RhoB no sólo se ancla a la membrana plasmática sino que también puede localizarse en endosomas. Esta localización vesicular característica de RhoB ha hecho que la proteína sea implicada en procesos de transporte intracelular (Adini et al. 2003; Huang et al. 2007; Vega et al. 2015).

6.1. Trombina estimula el tráfico intracelular de RhoB vesicular hacia y desde la membrana plasmática

Para testar si la trombina está estimulando el tráfico intracelular de RhoB, las células HUVECs fueron transfectadas con una construcción de RhoB unida a GFP, pre-tratadas con TNF y estimuladas con trombina para inducir contracción aguda. Estos ensayos revelaron que durante la expansión de la célula subsiguiente a la contracción, se produce una translocación de vesículas de RhoB desde el compartimento endosomal perinuclear hasta regiones en la periferia, cercanas a las expansiones nacientes de membrana. Así mismo, este transporte también se produce en sentido inverso. Desde la membrana plasmática emergen vesículas que van hasta el compartimento endosomal perinuclear. Constatamos que este transporte vesicular es inducido por la trombina, pues se observaba en menor medida en ausencia de contracción (Fig. 20A, B, C y vídeos 2 a 5).

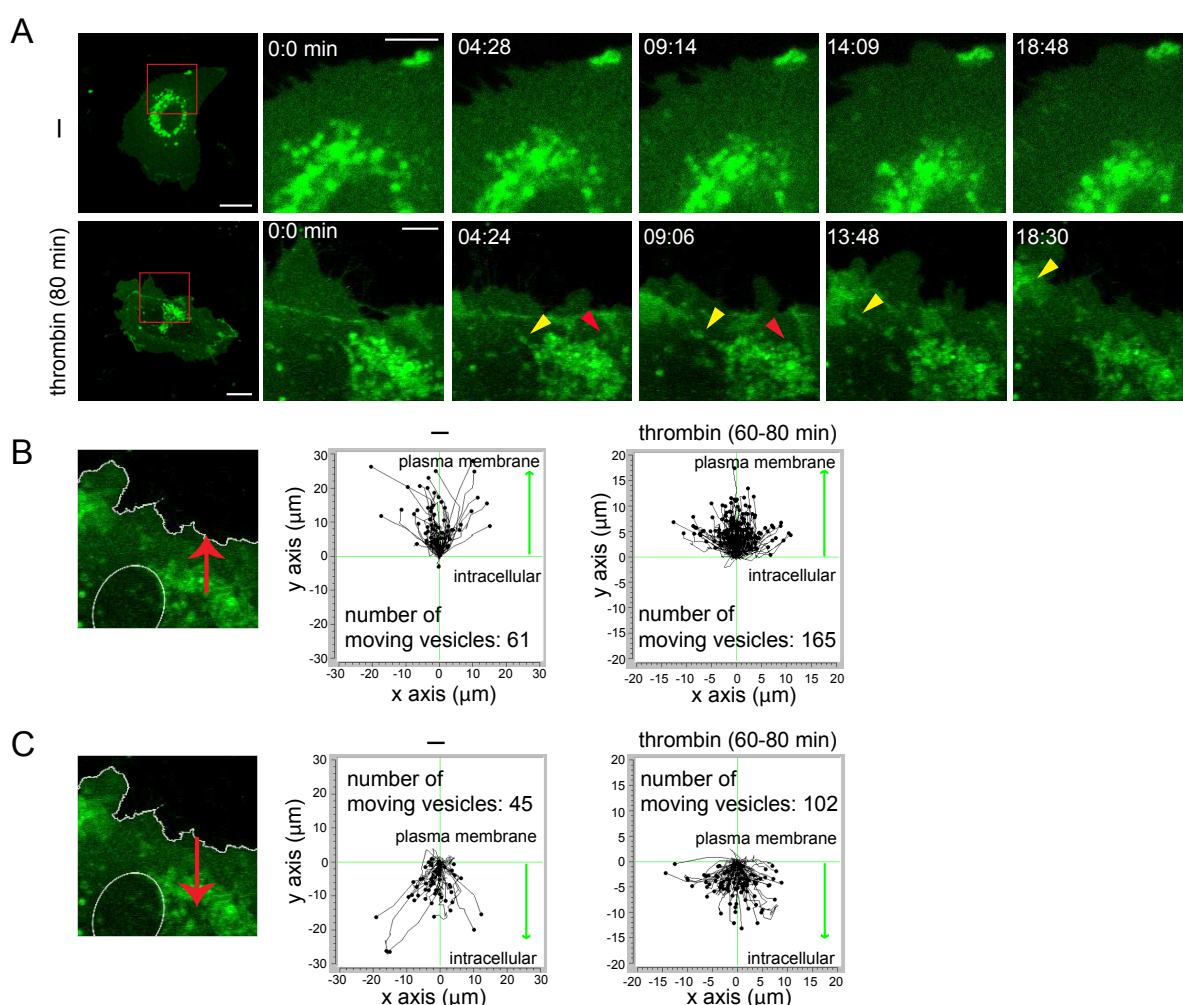


Figura 20. La trombina incrementa el tráfico vesicular de RhoB. (A). Células HUVECs que expresaron GFP-RhoB durante 24 horas fueron estimuladas con TNF durante 7 horas. Se les añadió o no trombina durante al menos 60 minutos y fueron analizadas por videomicroscopía confocal durante 20 minutos, tomando una imagen cada 20 segundos. Las puntas de flecha señalan dos ejemplos de vesículas positivas para RhoB que se desplazan hasta (amarilla) o desde (roja) la membrana plasmática en presencia de trombina. Barra de escala=20 μm , barra de escala del zoom=2 μm . (B) Trayectorias de vesículas de RhoB que emergen del compartimento interno perinuclear y se fusionan con la membrana plasmática en células con los tratamientos indicados se representan en un gráfico en el que todas parten de un punto común de origen. Se analizaron 12 células por condición. (C) Trayectorias de vesículas de RhoB que emergen de la membrana plasmática y se dirigen al compartimento intracelular en células con los tratamientos indicados. Son representadas en un gráfico en el que todas parten del mismo punto. Se analizaron 12 células por condición.

6.2. RhoB cambia su distribución en respuesta a trombina

La microscopía de alta resolución o super resolución ha superado el límite de difracción de la luz, permitiendo la captura de imágenes a una resolución mayor de lo que lo hacen los sistemas de microscopía confocal convencional (Ball et al. 2012; Choquet 2014). Para profundizar en la translocación de RhoB en respuesta a trombina, utilizamos técnicas de microscopía de super resolución. El sistema STED (microscopía de emisión depleción estimulada) se basa en el uso de un láser adicional que inactiva la emisión de fluorescencia

de los fluoróforos localizados fuera del centro de excitación del láser primario. Este sistema permite eliminar la fluorescencia emitida por los fluoróforos de la periferia del punto de interés, reduciendo la señal a un punto más preciso y mejorando la resolución de la imagen en ese área (Hell y Wichmann 1994). El análisis por STED de células estimuladas o no con trombina, fijadas y teñidas para RhoB reveló que el compartimento vesicular perinuclear en el que se concentra la proteína en células en reposo aparecía menos compacto en aquellas células que habían sido estimuladas con trombina (Fig. 21A).

El sistema STORM (Microscopia de Reconstrucción Óptica Estocástica) se basa en el uso del tiempo para fotografiar individualmente los fluoróforos que marcan la estructura objeto de estudio. Se usan fluoróforos que puedan ciclar entre un estado fluorescente y un estado oscuro y un láser de baja potencia que permite el paso del estado fluorescente al oscuro de manera espontánea. El sistema STORM permite excitar distintos fluoróforos aleatoriamente a distintos tiempos, localizarlos y desactivarlos. El resultado es una imagen de patrón punteado en la que cada punto representa la localización precisa de un fluoróforo o unos pocos fluoróforos (Betzig y Chichester 1993; Dickson et al. 1996; Rust, Bates, y Zhuang 2006). El uso de STORM en muestras fijadas de células endoteliales que habían sido previamente no estimuladas o estimuladas con trombina a dos tiempos diferentes y teñidas para RhoB confirmó el resultado obtenido con STED. La proteína RhoB aparecía más desorganizada y dispersa en condiciones de estimulación con trombina que en células en reposo. Pero además, el análisis por STORM reveló que el grado de compactación de las moléculas de RhoB en el compartimento endosomal también cambiaba en condiciones de estimulación con trombina. Mientras que en células no estimuladas las moléculas de RhoB aparecen muy compactadas en la región perinuclear y organizadas en grandes agregados que parecen corresponder a vesículas de gran tamaño, tras la estimulación con trombina las moléculas de RhoB pasan a organizarse en agregados más pequeños y a dispersarse (Fig. 21B). Con el objetivo de analizar estos cambios, utilizamos la función K de Ripley (Kiskowski, Hancock, y Kenworthy 2009) para analizar la distribución de moléculas en agregados de radio conocido y analizar el grado de agregación de RhoB. La función K de Ripley es una fórmula matemática que toma cada punto dentro de la imagen de STORM y traza alrededor de dicho punto una serie de círculos concéntricos de radio conocido (desde radio 1 pixel hasta el infinito) y determina el número de moléculas o puntos que quedan contenidos en el interior de cada círculo para cada molécula. El resultado del análisis es una gráfica que representa el número total de moléculas encontradas (eje Y) en función del radio del círculo (eje X). Para una distribución homogénea de las moléculas (ausencia de agregados) el resultado sería una línea que crece linealmente a medida que aumenta el radio del círculo (línea punteada Fig. 21C). Toda línea que crezca por encima de ésta indica presencia de agregados y cuanto más rápido sea el crecimiento (es decir, cuanto mayor sea la inclinación de la pendiente), indicará mayor compactación de las partículas y por lo tanto, mayor grado de agregación. Tras analizar las imágenes obtenidas con STORM usando la función K de Ripley confirmamos una diferencia en el grado de agregación de las moléculas de RhoB entre células no estimuladas o estimuladas con trombina, de tal forma que la pendiente de la función resultante del análisis de células no estimuladas era mayor que la de células estimuladas con trombina (Fig. 21C).

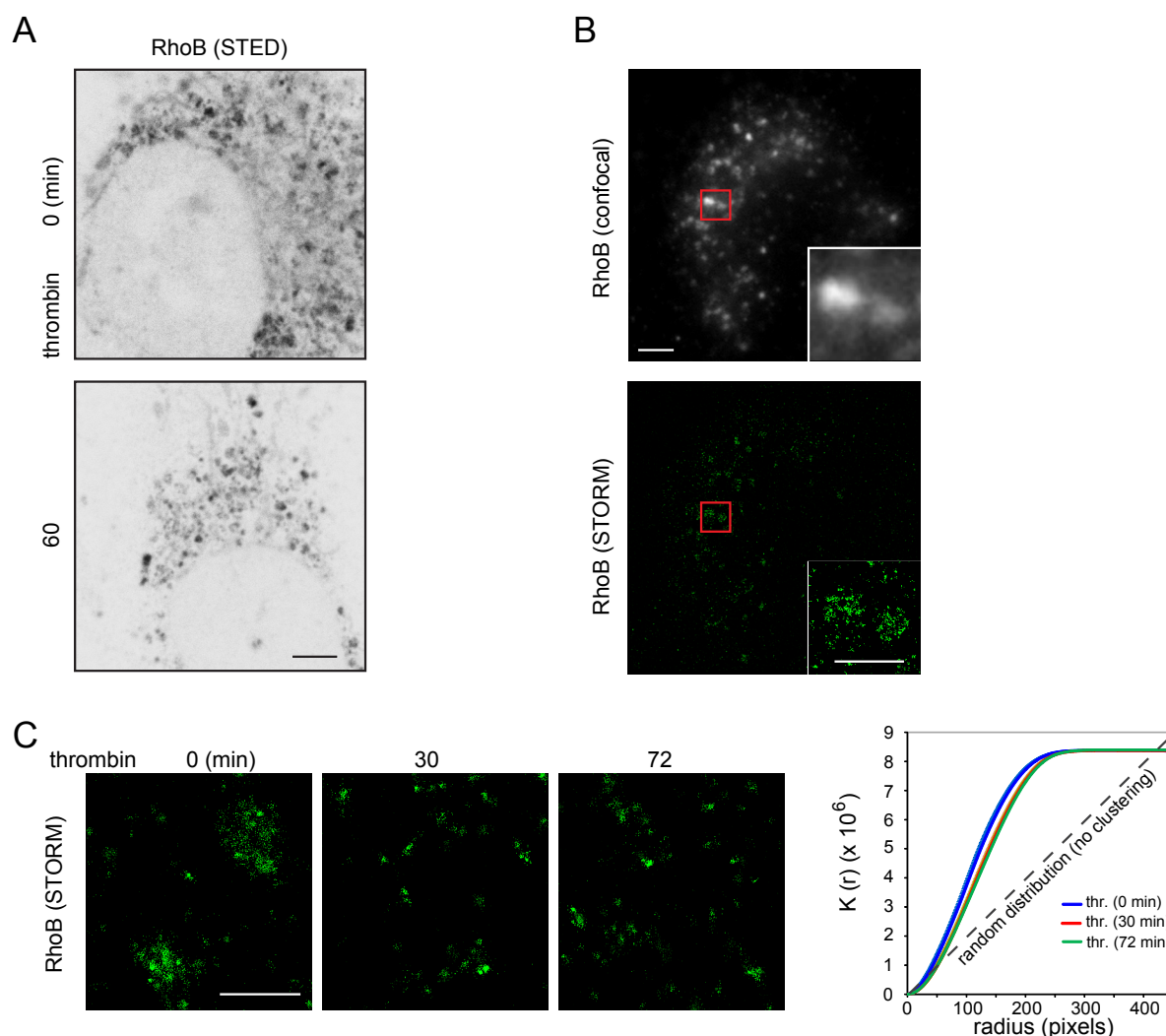


Figura 21. La trombina reduce los nano-acúmulos de RhoB durante la expansión celular. (A) Imágenes de súper-resolución del compartimento vesicular perinuclear de RhoB generadas por Microscopía de Emisión Depleción Estimada (STED) en células HUVECs tratadas con TNF y estimuladas o no con trombina durante 60 minutos. Señal de RhoB en escala de grises invertida. Barra de escala=5 μ m. (B) Imagen de súper-resolución confocal de las vesículas perinucleares de RhoB en células HUVECs tratadas con TNF generada por Microscopia de Reconstrucción Óptica Estocástica (STORM). Barra de escala=5 μ m, barra de escala del zoom=2 μ m (C) Imágenes de STORM representativas de los acúmulos de RhoB en vesículas intracelulares durante la estimulación con trombina en células previamente tratadas con TNF. Barra de escala=1 μ m. Tamaño de píxel=10nm. El grado de acumulación de las partículas de RhoB se determinó mediante el cálculo de la constante K de Ripley en cada imagen de súper-resolución. La línea punteada indica una distribución teórica homogénea de las partículas, valores por encima de la línea punteada indican agregación en la distribución de RhoB. Cuanto mayor sea la pendiente de la curva más agregación se está detectando. Se analizaron al menos 10 imágenes por condición procedentes de tres experimentos independientes.

Todos estos resultados sugieren que, tras la estimulación con trombina, RhoB se activa y se re-organiza en acúmulos de menor tamaño. Además, durante la recuperación las vesículas de RhoB son muy móviles y se desplazan entre la región perinuclear y la membrana plasmática.

7. RhoB regula la actividad y localización de Rac1

Las subfamilias de Rho GTPasas Rho y Rac son claves en la regulación de las dinámicas del citoesqueleto de actina (Heasman y Ridley 2008). Además, existen numerosas evidencias de que miembros de ambas familias participan en los mismos procesos regulando mutuamente sus funciones (Rosenfeldt et al. 2006; Bustos et al. 2008; Vega et al. 2012; Schmidt et al. 2013; Abreu-Blanco, Verboon, y Parkhurst 2014; Lawson y Burridge 2014). Previamente, habíamos observado que el silenciamiento de RhoB inducía la extensión de las células y la aparición de amplias estructuras membranosas con aspecto de lamelipodio (Fig. 19B). Siendo Rac el regulador por antonomasia del lamelipodio (Kozma et al. 1996; Ridley et al. 1999; Small et al. 2002), hipotetizamos que RhoB podría estar regulando su actividad y función.

7.1. RhoB y Rac1 colocalizan parcialmente en un compartimento positivo para Rab5

Dada la ausencia de anticuerpos que permitan detectar claramente la proteína endógena por inmunofluorescencia, el análisis de la localización de Rac1 se realizó mediante la expresión de Rac1 unida al epítipo fluorescente mCherry. La expresión en células endoteliales reveló que la GTPasa se localiza en la membrana plasmática y en vesículas intracelulares, la mayor parte de las cuales se encuentran concentradas en la región perinuclear (Fig. 22A). Esta distribución intracelular es compatible con la descrita para Rac1 en otros tipos celulares (Faucherre et al. 2003; Palamidessi et al. 2008). La expresión conjunta de Rac1 con la forma constitutivamente activa de RhoB en células estimuladas con trombina mostró la colocalización clara de ambas proteínas en el compartimento vesicular perinuclear y en vesículas dispersas y fuera de este compartimento (Fig. 22B). Se ha propuesto que el efecto de Rac sobre la formación de extensiones de membrana ricas en F-actina requiere su tráfico a través de un compartimento positivo para Rab5 donde Rac1 encuentra maquinaria para ejercer su función al reciclar hacia el borde celular (Palamidessi et al. 2008). Una triple tinción señaló a las vesículas de Rac1 y RhoB como positivas para el marcador de endosomas tempranos Rab5 (Fig. 22C). La tinción de la forma exógena de Rac1 con RhoB endógeno confirmó la colocalización en el compartimento vesicular de células confluentes pre-tratadas con TNF. Durante la recuperación de la monocapa tras la inducción de la contracción aguda con trombina, Rac1 y RhoB mantuvieron la colocalización en vesículas pero no colocalizaron en la membrana plasmática, donde Rac1 se situó en extensiones tipo lamelipodio de donde RhoB estaba mayoritariamente ausente (Fig. 22D, zona ampliada). Además, un análisis más detallado mediante STED confirmó la colocalización de RhoB y Rac1 en las mismas vesículas, pero en dominios de membrana distintos (Fig. 22E, cabeza de flecha).

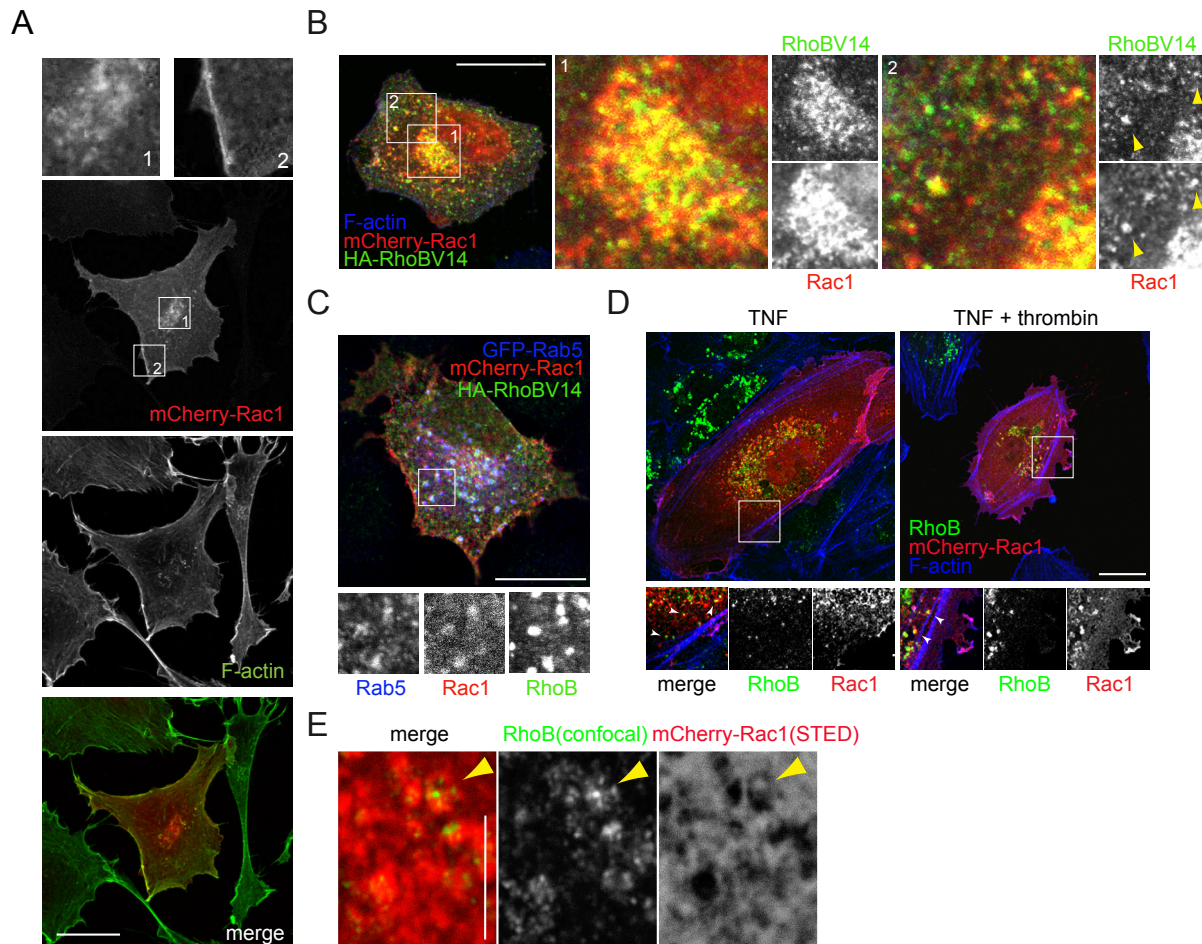


Figura 22. RhoB colocaliza con Rac1. (A) Células HUVECs fueron transfectadas con mCherry-Rac1, fijadas a las 48 horas y teñidas para actina filamentosa. Las ampliaciones muestran la localización de Rac1 en un compartimento vesicular perinuclear (1) y en la membrana plasmática (2). Barra de escala=20 μm (B) mCherry-Rac1 colocaliza con RhoB activo en compartimentos intracelulares. mCherry-Rac1 y HA-RhoBV14 fueron expresados en células EA.hy.926. Se observa una colocalización significativa en un compartimento vesicular perinuclear (1) y en vesículas dispersas por el citosol (2, puntas de flecha) Barra de escala=20 μm. (C) HA-RhoBV14 y mCherry-Rac1 colocalizan en vesículas positivas para Rab5-GFP. Las imágenes de la derecha muestran una ampliación del área recuadrada. Barra de escala=20 μm. (D) RhoB endógeno y mCherry-Rac1 colocalizan parcialmente en un compartimento vesicular perinuclear y en vesículas dispersas (puntas de flecha) en células HUVECs confluentes y tratadas con TNF, estimuladas o no con trombina durante 72 minutos. mCherry-Rac1 se localiza además en protrusiones nacientes de membrana de las que RhoB está ausente durante la recuperación en células estimuladas con trombina durante 60 minutos. Barra de escala=20 μm. (E) Imágenes de súper-resolución de Rac1 obtenidas por microscopía STED. Los acúmulos de Rac1 (escala de grises invertida) parecen ser diferentes de los de RhoB dentro de la misma vesícula (puntas de flecha). Barra de escala=4 μm.

7.2. La sobreexpresión de un mutante constitutivamente activo o el silenciamiento de RhoB altera la localización subcelular de Rac1

Para determinar si RhoB estaba alterando la localización subcelular de Rac1, la actividad de RhoB fue aumentada de forma artificial por transfección de una forma constitutivamente activa de RhoB o disminuida por silenciamiento génico con siRNA. Mientras que la sobreexpresión de RhoBV14-HA redujo notablemente la localización de mCherry-Rac1 en la membrana plasmática (Fig. 23A), incluso en células que están correctamente expandidas y adheridas al sustrato, el silenciamiento de RhoB favoreció la localización de Rac1 en la membrana plasmática, en regiones claramente diferenciadas como lamelipodios donde se estaba produciendo la extensión de la célula sobre el sustrato (Fig. 23B).

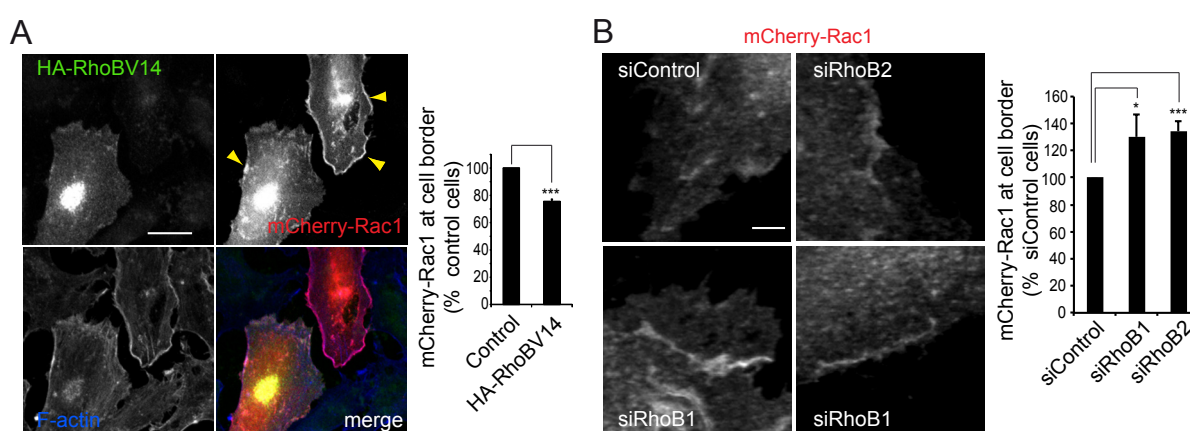


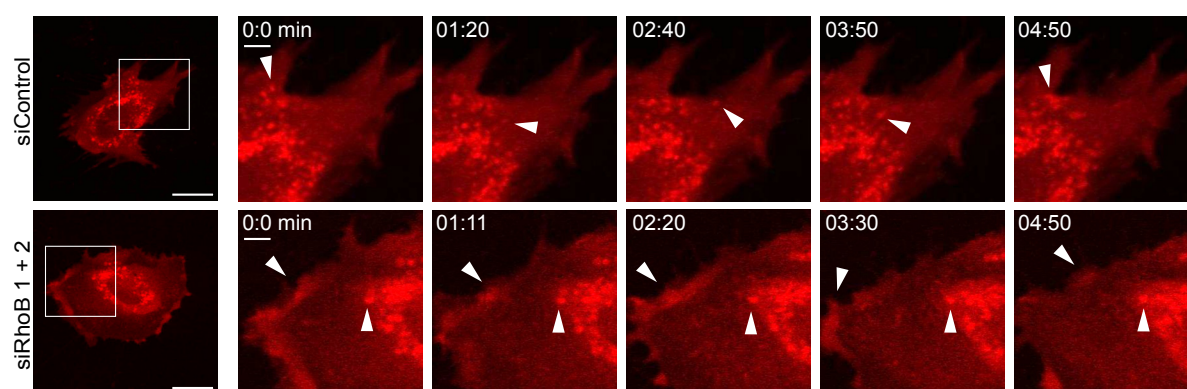
Figura 23. La sobreexpresión de un mutante constitutivamente activo o el silenciamiento de RhoB altera la localización subcelular de Rac1. (A) RhoB activo reduce la localización de Rac1 en la membrana plasmática. mCherry-Rac1 y HA-RhoBV14 fueron expresados en células EA.hy.926 durante 48 horas, fijadas y teñidas para HA y actina filamentosa. El gráfico de la derecha cuantifica la localización relativa de mCherry-Rac1 en el borde celular y muestra el promedio + SEM de al menos 10 células por experimento de tres experimentos independientes. Las puntas de flecha señalan mCherry-Rac1 en la membrana plasmática. Nótese que RhoBV14 reduce la localización de Rac1 en el borde celular incluso en células correctamente expandidas sobre el sustrato. ***, p-valor=5.30x10⁻⁵. Barra de escala=20 µm. (B) Células HUVECs fueron transfectadas con los siRNA indicados y después mCherry-Rac1 fue expresado durante 24 horas. Las células fueron tratadas con TNF durante 7 horas, estimuladas con trombina durante 60 minutos y fijadas. La gráfica muestra la cuantificación relativa de mCherry-Rac1 en el borde celular como la media + SEM de al menos 10 células por experimento de cinco experimentos independientes. *, p valor=0.026; ***, p valor=5x10⁻⁴. Barra de escala=2µm.

7.3. El silenciamiento de RhoB altera la movilidad del compartimento endosomal de Rac1

La formación de dominios de membrana durante la migración celular requiere del tráfico de Rac entre la membrana plasmática y un compartimento endosomal positivo para Rab5 (Palamidessi et al. 2008). Para saber si RhoB podría estar alterando el tráfico de Rac1 durante la extensión de la célula tras una contracción aguda, células HUVECs fueron silenciadas para RhoB y posteriormente transfectadas con la construcción mCherry-Rac1. Los ensayos de videomicroscopía para estudiar el tráfico de Rac1 en estas condiciones evidenciaron que

en células transfectadas con un siRNA control los endosomas de Rac1 eran muy móviles y ciclaban entre la región perinuclear y la membrana plasmática mientras que en las células con niveles reducidos de RhoB, una gran cantidad de Rac1 estaba localizada en la membrana plasmática y los endosomas se encontraban concentrados en la región perinuclear de forma más compactada, siendo poco móviles (Fig. 24A,B y vídeos 6 a 9).

A



B

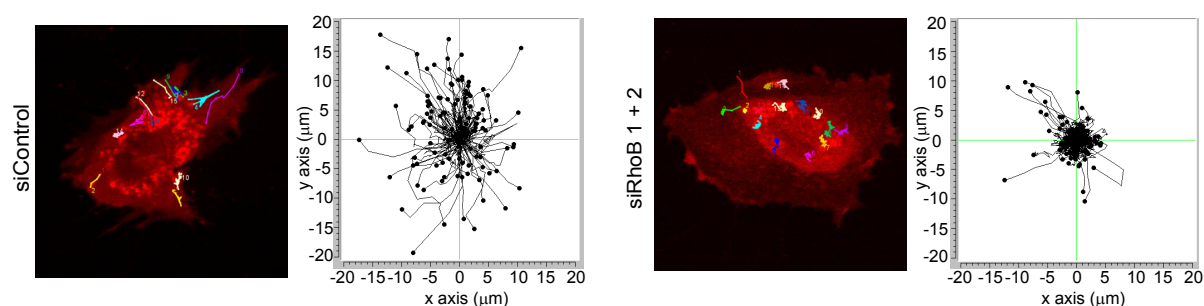


Figura 24. RhoB regula el tráfico de Rac1. (A) Se expresó mCherry-Rac1 durante 24 horas en HUVECs previamente transfectadas con los siRNAs indicados. Las células fueron tratadas con TNF durante 7 horas y después estimuladas con trombina durante 60 a 100 minutos. Imágenes representativas de ensayos de videomicroscopía confocal que muestran el movimiento vesicular de Rac1 (puntas de flecha). Se tomó una imagen cada 15 segundos durante 5 minutos. Barra de escala= 20μm. (B) A partir de los vídeos de A, se trazaron las trayectorias de las vesículas de Rac1. Los gráficos representan las trayectorias de 15 vesículas por célula de 8 células procedentes de tres experimentos independientes. Las trayectorias se representan con un punto común de origen.

7.4. RhoB regula la actividad de Rac1

Durante su tráfico entre la membrana plasmática y el compartimento endosomal, Rac entra en contacto con las proteínas que determinan su activación (GEFs) en los endosomas y se recicla hacia la membrana plasmática (Palamidessi et al. 2008). Además, la actividad de Rac1 disminuye durante los primeros minutos tras la estimulación con trombina para ir aumentando gradualmente después (Valérie Vouret-Craviari et al. 2002). Con el objetivo de determinar si RhoB estaba alterando la activación de Rac1, se realizaron ensayos de *pull-down* en células en condiciones de subconfluencia, previamente silenciadas para RhoA

como control o RhoB y estimuladas con trombina durante 60 minutos. El resultado reveló que el silenciamiento de RhoA no altera la actividad de Rac1, aunque tiene un efecto en los niveles totales de la proteína. En cambio, la actividad de Rac1 aumentó en aquellas células que carecían de RhoB (Fig. 25A, B).

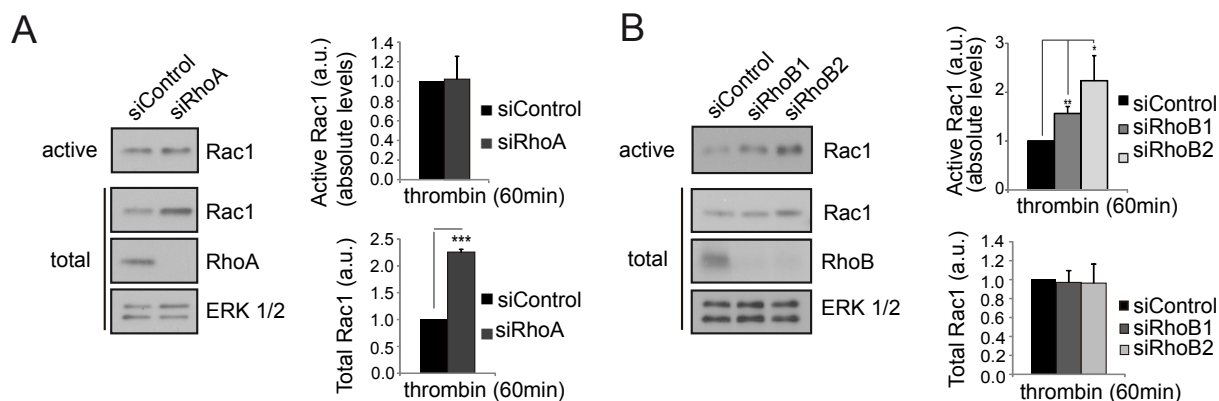


Figura 25. RhoB regula la actividad de Rac1. (A) Ensayos de *pull-down* para detectar la actividad de Rac1 en HUVECs transfectadas con siRNA control o dirigido contra RhoA durante 72 horas, tratadas con TNF durante 7 horas y estimuladas con trombina durante 60 minutos. Los gráficos de la derecha muestran el promedio + SEM de tres experimentos distintos expresado como los valores absolutos de Rac1-GTP (*active*) o de Rac1 total. ***, p-valor=8.85x10⁻⁶. (B) Efecto de los siRNAs de RhoB sobre la actividad de Rac1 en células tratadas como en A. Los gráficos de la derecha muestran el promedio + SEM de tres experimentos distintos expresados como los valores absolutos de Rac1-GTP (*active*) o de Rac1 total. **, p-valor=0.002; *, p-valor=0.037.

7.5. La sobreexpresión de un mutante constitutivamente activo altera la capacidad de Rac1 para regular la expansión celular

Las células HEK293 son una línea celular establecida que deriva de células de riñón de embrión humano y que se caracterizan por adherirse al sustrato con una morfología redondeada. La sobreexpresión de mCherry-Rac1 es suficiente para inducir un aumento del área de adhesión al sustrato. Decidimos aprovechar este efecto para analizar si la actividad de RhoB regula la extensión de membrana exclusivamente dependiente de Rac1. Se sobreexpresó, por tanto Rac1 individualmente o conjuntamente con RhoBV14-HA y se cuantificó el área celular. Al sobreexpresar la forma constitutivamente activa de RhoB conjuntamente con mCherry-Rac1, se inhibió completamente la expansión de la célula inducida por Rac1 (Fig.26A, B), indicando que una expansión de membrana específicamente producida por Rac1 puede ser inhibida por la activación de RhoB.

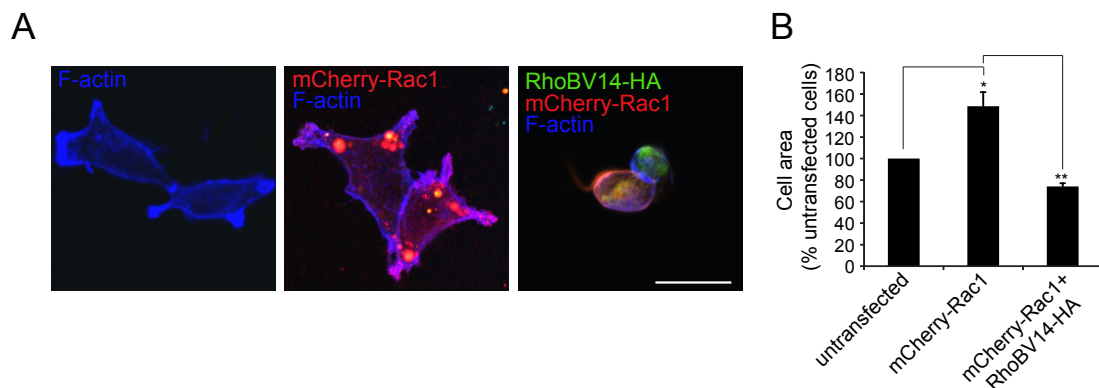


Figura 26. RhoB activo regula negativamente las extensiones de membrana inducidas por Rac1. (A) La expresión de mCherry-Rac1 en células HEK293 es suficiente para inducir protrusiones de membrana. La co-expresión de RhoBV14 inhibe las protrusiones membranosas inducidas por Rac1. Barra de escala=20μm. (B) El gráfico cuantifica el área celular de al menos 12 células por condición procedentes de tres experimentos independientes y muestra la media + SEM, *, p-valor=0.011; **, p-valor=0.003.

7.6. El tráfico endosomal es esencial para la recuperación de la barrera endotelial

Los resultados anteriores parecen indicar que el tráfico hacia y desde la membrana plasmática es importante para la expansión de las células sobre el sustrato y por lo tanto para la restauración de la monocapa endotelial. Para testar si el tráfico endosomal afecta a la recuperación de la monocapa tras la contracción mediada por trombina, se añadieron inhibidores farmacológicos del tráfico intracelular a células HUVECs en el punto de máxima contracción tras la estimulación con trombina y se estudiaron los cambios en el proceso de recuperación en el ECIS.

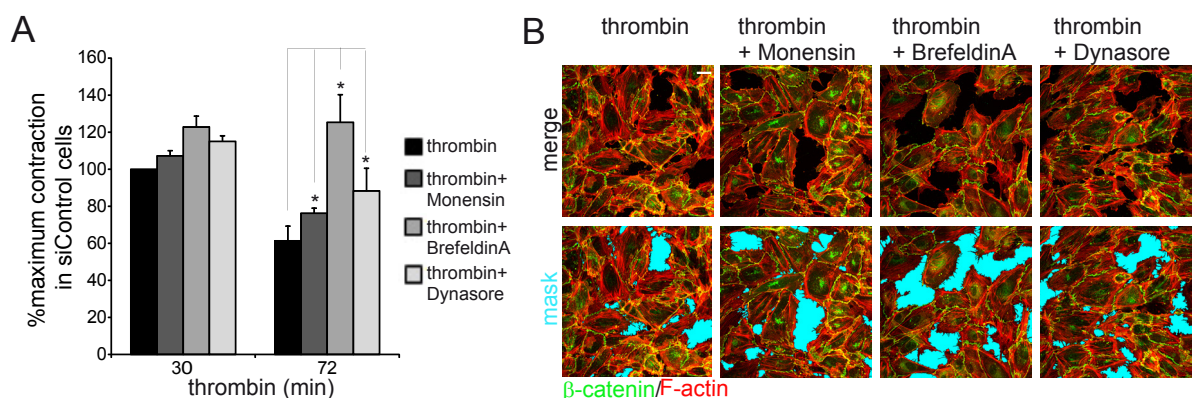


Figura 27. El tráfico endosomal es esencial para la recuperación de la barrera endotelial. (A) Inhibidores del tráfico intracelular retrasan la recuperación de la función de barrera. Células HUVECs previamente tratadas con TNF fueron estimuladas con trombina y tras 20 minutos se añadieron los inhibidores del tráfico intracelular Monensina (10 μM) y BrefeldinaA (35 μM) o el inhibidor de la dinamina *Dynasore* (60 μM). Cambios en la TEER fueron analizados con el ECIS y cuantificados a los tiempos indicados. El gráfico muestra el promedio + SEM de cuatro experimentos independientes. *, p-valor<0.031. (B) HUVECs pre-tratadas con TNF fueron estimuladas con trombina durante 72 minutos en presencia o ausencia de los inhibidores mencionados, fijadas y teñidas para β-catenina y actina filamentosa. Se aplicó un análisis automatizado de las imágenes para detectar los espacios vacíos entre células en la monocapa endotelial (*mask*). Barra de escala=20 μm.

La BrefeldinaA es un antibiótico que inhibe el transporte proteico entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi, provocando la acumulación de proteínas en el retículo y el colapso de las cisternas del Golgi (Pelham 1991; Klausner, Donaldson, y Lippincott-Schwartz 1992). El Dynasore es un inhibidor de la GTPasa dinamina, encargada de la escisión del endosoma durante su formación a partir de una membrana celular (Macia et al. 2006). La Monensina es un antibiótico que funciona como ionóforo al transportar cationes a través de las membranas celulares, lo que resulta en la neutralización del pH ácido en los endosomas y a la inhibición del transporte intracelular (Mollenhauer, Morré, y Rowe 1990). La adición de cualquiera de los tres inhibió significativamente la recuperación de la monocapa endotelial medida con ECIS o por inmunofluorescencia (Fig. 27A, B).

7.7. La alteración del tráfico y la actividad de Rac1 afectan a la recuperación de la barrera endotelial tras la contracción inducida por trombina

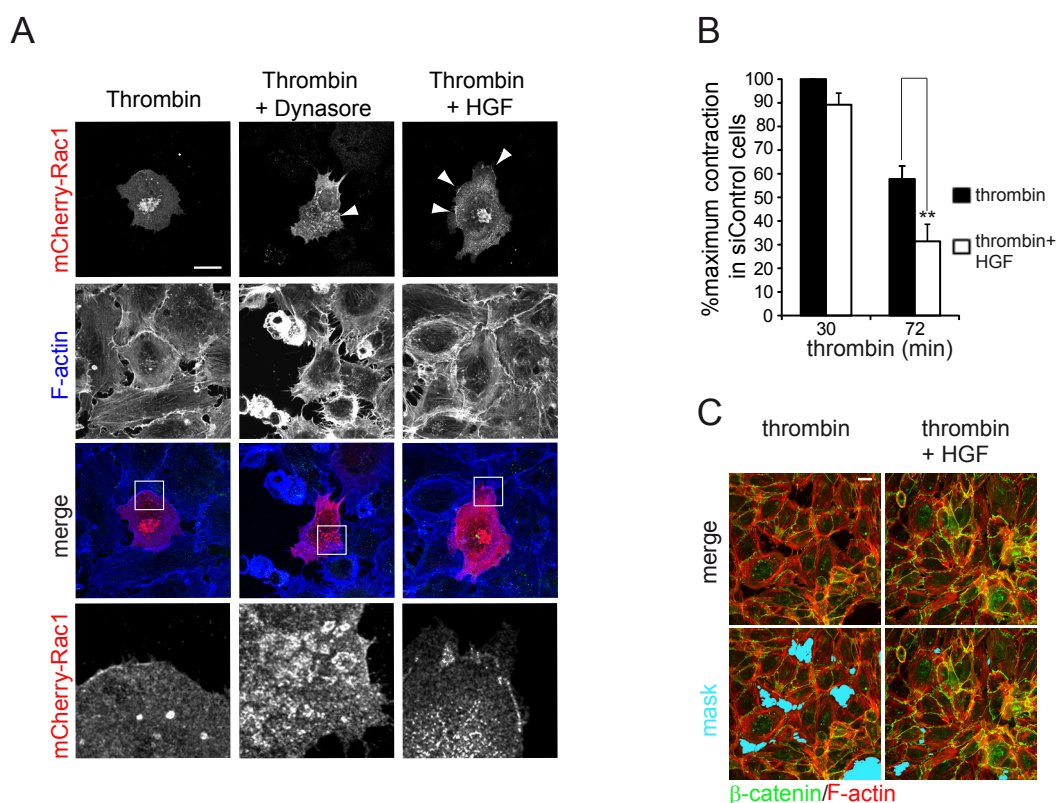


Figura 28. El tráfico de Rac es esencial para la recuperación de la función de barrera tras la estimulación con trombina. (A) Efecto de *Dynasore* y HGF en la localización de mCherry-Rac1. Células EA.hy.926 fueron transfectadas con mCherry-Rac1, pre-tratadas con TNF y estimuladas con trombina. Tras 20 minutos se añadió donde se indica *Dynasore* (60 μ M) y HGF (30ng/ml). Las células fueron fijadas y teñidas para actina filamentosa y el epítipo cherry. Barra de escala=20 μ m. (B) HGF acelera la reformación de la monocapa endotelial en células pre-tratadas con TNF. El gráfico muestra los cambios en la TEER analizados con el ECIS y expresados en términos de contracción relativa respecto de las células tratadas con siRNA control. La adición de HGF se produjo 20 minutos tras la estimulación con trombina cuando se indica. Los datos se expresan como la media + SEM de ocho experimentos independientes. **, p-valor=0.006. (C) Células HUVECs fueron procesadas como en B, fijadas a los 72 minutos tras la adición de trombina y teñidas para las proteínas indicadas. Se aplicó un análisis de las imágenes automatizado para detectar las áreas vacías en la monocapa endotelial (*mask*). Barra de escala=20 μ m.

Previamente, se ha demostrado que el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) activa e induce la translocación de Rac1 desde el compartimento endosomal hasta la membrana plasmática en células no endoteliales (Palamidessi et al. 2008), por lo que decidimos emplear el HGF en nuestro sistema para inducir la activación y translocación de Rac1 durante la reformación de la barrera endotelial. La adición de HGF a las células endoteliales en el punto de máxima contracción, y por lo tanto al inicio del proceso de recuperación de la monocapa, indujo la translocación de Rac1 a la membrana plasmática, mientras que la adición de los anteriores inhibidores como el dynasore tras la contracción, confinó a Rac en estructuras vesiculares gigantes intracelulares (Fig. 28A). El tratamiento con HGF tuvo el efecto contrario al de los inhibidores del tráfico intracelular y aceleró la recuperación de la función de barrera a niveles comparables con los observados tras el silenciamiento de RhoB (Fig. 28B, C) y en consonancia con lo que habían observado otros autores (Birukova et al. 2007).

7.8. El efecto de RhoB sobre la restauración de la barrera endotelial es dependiente de Rac

Finalmente, para demostrar que Rac1 está mediando los efectos del silenciamiento de RhoB sobre la recuperación tras la contracción protrombótica, decidimos inhibir Rac al mismo tiempo que silenciar RhoB. La inhibición de Rac induce un aumento de la permeabilidad en células endoteliales que no han sido expuestas a ningún estímulo (Wójciak-Stothard et al. 2001). Este hecho nos previno de utilizar siRNA para inhibir Rac y optamos, en cambio, por la utilización de un inhibidor de probada eficacia en la inhibición de la GTPasa (Raz et al. 2010; Shirvaikar et al. 2011) y que además nos permitía un control temporal sobre la actividad de Rac. NSC23766 es un inhibidor específico de las tres proteínas Rac (Konstantinidis et al. 2012) que impide la unión de las GTPasas a las GEFs Trio y Tiam1 que determinan su activación (Gao et al. 2004).

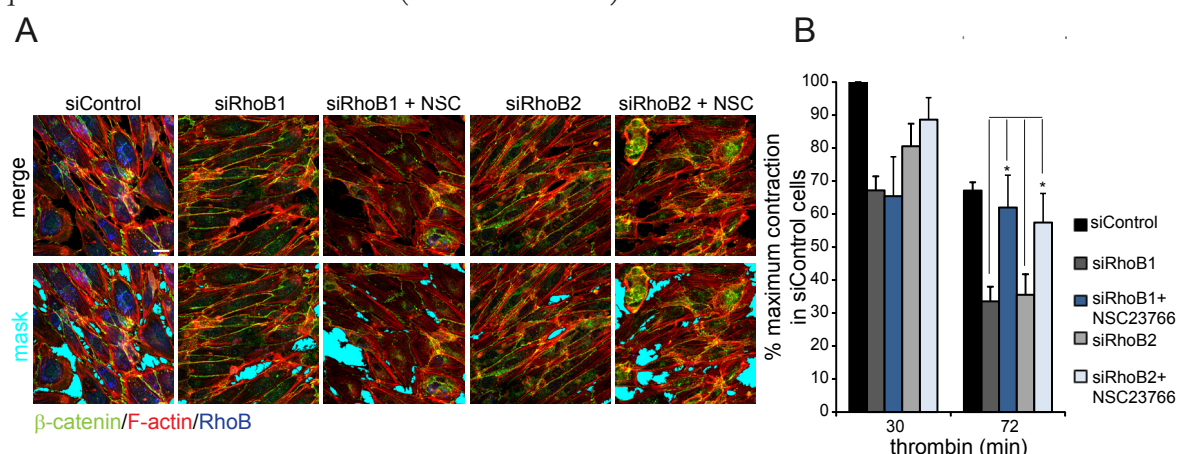


Figura 29. El efecto de RhoB sobre la restauración de la barrera endotelial es dependiente de Rac1 (A) Células HUVECs transfectadas con los siRNA indicados y tratadas con TNF fueron estimuladas con trombina durante 72 minutos. Tras 20 minutos de la adición de trombina se añadió el inhibidor de Rac NSC23766 (100 μ M) donde se indica. Las células se fijaron y se tiñeron para las proteínas indicadas. Se aplicó un análisis automático de las imágenes en Image J para detectar los huecos en la monocapa (*mask*). Barra de escala=20 μ m. (B) La TEER de células HUVECs procesadas como en A fue analizada en el ECIS. El gráfico representa la TEER expresada en términos de contracción relativa a los 30 y 72 minutos post-estimulación. Se muestra la media + SEM de cinco experimentos independientes. *, p-valores<0.036.

La adición de NSC23766 en el punto de máxima contracción de células que habían sido previamente silenciadas para RhoB canceló completamente la aceleración del proceso de recuperación de función de barrera, llevándolo a niveles similares a los de las células control (Fig. 29A, B). Todos estos resultados en conjunto indican que Rac1 media el efecto de RhoB sobre la recuperación de la función de barrera endotelial.

7.9. Efecto diferencial de RhoB y Rac1 en la recuperación de la función de barrera en células en reposo o inflamadas con TNF

Uno de los primeros resultados de esta memoria evidenció que TNF aumenta la expresión de RhoB (Fig. 1A). Al testar cuál es la contribución de RhoB a la recuperación de la función de barrera en ausencia de estimulación con TNF, y por lo tanto cuando la GTPasa se expresa a bajos niveles, encontramos que en este caso el silenciamiento de RhoB tiene un efecto menor y no significativo sobre el proceso de la recuperación (Fig. 30A en comparación con Fig. 16A). Al testar el inhibidor de Rac NSC23766 en la recuperación de la monocapa endotelial en células no inflamadas encontramos que el efecto fue moderado y que, aunque retrasó la recuperación de la monocapa en una hora, no impidió una recuperación completa. Sin embargo, en células previamente tratadas con TNF este inhibidor previno la recuperación completa de la barrera al menos hasta 4 horas después de la estimulación con trombina (Fig. 30B).

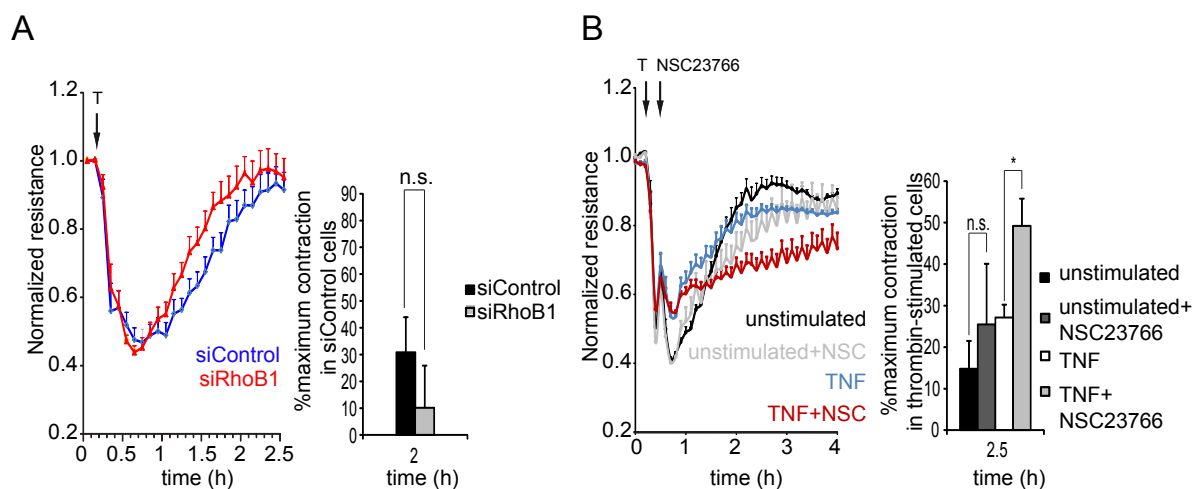


Figura 30. Efecto diferencial de RhoB y Rac1 en la recuperación de la función de barrera en células en reposo o inflamadas con TNF. (A) Células HUVECs fueron transfectadas con los siRNAs indicados y se analizó el efecto de trombina (T) en la TEER a través del ECIS. Se muestra la media + SEM de cinco experimentos independientes. La gráfica cuantifica la TEER a las 2 horas post-estimulación expresada como contracción relativa en función del punto de máxima contracción de las células tratadas con el siRNA control. (n.s., no significativo) (B) TNF aumenta la sensibilidad de la monocapa endotelial al inhibidor de Rac. El efecto del inhibidor de Rac NSC23766 en la TEER de células HUVECs estimuladas con trombina que además fueron tratadas o no con TNF fue analizado a través del ECIS; (T) trombina. Se muestra la media + SEM de tres experimentos independientes. La gráfica cuantifica la TEER a las 2,5 horas post-estimulación expresada como contracción relativa en función del punto de máxima contracción de las células tratadas solo con trombina. *, p-valor=0.011.

Uno de los mayores retos de la investigación terapéutica actual es el hallazgo de dianas terapéuticas específicas del tejido enfermo, de tal forma que éstas supongan una ventaja a la

hora de atacar al tejido enfermo sin afectar al sano, reduciéndose así los efectos secundarios. En nuestro caso, los resultados anteriores en su conjunto demuestran que RhoB y Rac juegan un papel más importante en la recuperación de la barrera endotelial en un contexto inflamatorio. Un control terapéutico de la actividad de RhoB y de Rac podría, por tanto, modular preferentemente la integridad de la barrera endotelial en las zonas inflamadas sin afectar al entorno vascular sano.

8. RhoB regula la activación y localización de Akt durante la contracción aguda endotelial

Debido a su importancia en la migración, los mecanismos moleculares que regulan la expansión de la célula y la formación y extensión del lamelipodio han sido extensamente estudiados. Algunos artículos publicados recientemente señalan a la vía de señalización PI3K-akt como una ruta importante para la regulación de este proceso (Ackah et al. 2005; Bousquet et al. 2009; Johnson et al. 2015). Por otro lado, se ha descrito que RhoB está implicada en el tráfico y la activación de Akt en otros tipos celulares (Chen et al. 2000, Adini et al. 2003, Mazières et al. 2005, Bousquet et al. 2009, Alfano et al. 2012; Kazerounian et al. 2013). El efecto de RhoB sobre Akt durante la migración e invasión de células tumorales requiere la actividad de Rac, sugiriendo que Akt se encuentra debajo de RhoB y Rac en esta ruta señalizadora (Bousquet et al. 2009). Con estos datos previos, hipotetizamos que, RhoB podría estar regulando la activación y/o localización de Akt y que, a su vez, Akt podría regular la expansión de la célula y la formación de lamelipodios en células endoteliales, contribuyendo así a la recuperación de la función de barrera tras la contracción protrombótica.

8.1. RhoB regula la fosforilación de Akt en respuesta a trombina en los residuos que determinan su activación

Algunas citoquinas y factores de crecimiento son capaces de activar la vía de señalización PI3K-Akt al interactuar con receptores de superficie, que reclutan y activan a la quinasa fosfatidilinositol 3 (PI3K). PI3K fosforila fosfatinosítidos (PIP₂) de la membrana plasmática y genera fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP₃). Este lípido actúa como una molécula señalizadora, reclutando a la superficie celular a las quinasas PDK y Akt. Akt es activada por la fosforilación de las PDKs en su dominio de activación (Thr308) y en su dominio funcional hidrofóbico (Ser473) y desde su localización en la membrana plasmática es capaz de fosforilar y activar a sus efectores (Vanhaesebroeck y Alessi 2000). Nosotros hipotetizamos que RhoB podría estar regulando la fosforilación y activación de Akt durante la recuperación de la contracción protrombótica en células endoteliales. Para testarlo, células HUVECs fueron tratadas con un siRNA control o dirigido contra las GTPasas RhoA y RhoB, estimuladas con TNF y trombina a los tiempos indicados y lisadas. La fosforilación de Akt fue analizada por *western blot* usando dos anticuerpos específicos que detectan los residuos fosforilados de Akt que determinan su activación (Thr308 y Ser473). Trombina indujo una defosforilación de Akt. En células tratadas con el siRNA control, se produjo una reducción en la fosforilación en ambos residuos, que se hizo máxima a los 30 minutos post-

estimulación y fue aumentando gradualmente después. En el caso de células silenciadas para RhoB, al comparar con las células control se observó que había más Akt fosforilado antes de la estimulación con trombina y esta diferencia se hizo más evidente tras la estimulación. Mientras que en células control, al cabo de 30 minutos tras la estimulación con trombina, el porcentaje de Akt fosforilado se había reducido desde el 100% al 20% en Ser473 y al 30% en Thr308, en el caso de células silenciadas para RhoB el porcentaje de Akt fosforilado a los 30 minutos post-estimulación era del 50 al 60% para Ser473 y del 60 al 75% para Thr308 (Fig. 31A, B). Hay que destacar también que en ausencia de contracción, Akt no parece tener una función esencial puesto que el silenciamiento de RhoA redujo su fosforilación sin efecto aparente en la permeabilidad endotelial.

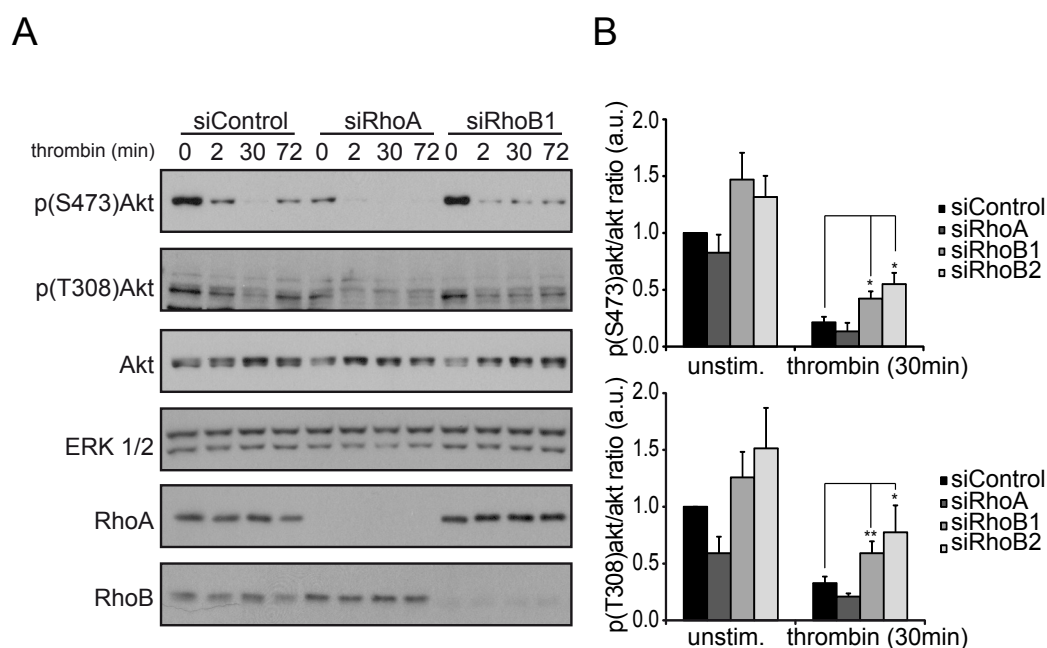


Figura 31. RhoB regula la fosforilación de Akt. (A) Células HUVECs fueron transfectadas con siRNA, tratadas con TNF durante 7 horas y estimuladas o no con trombina durante distintos tiempos. Las células fueron lisadas en presencia de inhibidores de fosfatasas y analizadas por *western-blot* con los anticuerpos indicados. (B) Los gráficos representan la cuantificación de los niveles de fosforilación de los residuos Serina 473 y Treonina 308 de Akt antes y 30 minutos después de la estimulación con trombina, normalizados frente a los niveles totales de Akt y expresados como la media + SEM de al menos tres experimentos independientes. * p-valores<0.05, ** p-valor<0.005.

8.2. Akt regula la expansión de la célula endotelial sobre el sustrato

Previamente, habíamos observado que el silenciamiento de RhoB afecta a la expansión de las células sobre el sustrato y a la formación de extensiones de membrana durante la recuperación tras la contracción protrombótica (Fig. 19B, C). Tras hipotetizar que RhoB podría regular este proceso también a través de Akt, células HUVECs fueron silenciadas para RhoB, sembradas en subconfluencia y tratadas con dos inhibidores de la ruta PI3K-Akt. LY294002 es un inhibidor de la PI3K que actúa en el dominio de unión a ATP de la enzima (Vlahos et al. 1994), mientras que el inhibidor de Akt VIII inhibe específicamente las isoformas de Akt al unirse a estas proteínas e inhibir su fosforilación y activación por PDK, manteniéndolas en una conformación inactiva (Barnett et al. 2005). Como era lo

esperado, la adición de los inhibidores a células tratadas con el siRNA control inhibió la fosforilación de Akt en los dos residuos que determinan su activación (Fig. 32A). Además inhibieron el aumento en el área celular inducido tras el silenciamiento de RhoB (Fig. 32B, C). Estos resultados sugieren que RhoB regula la expansión de la célula sobre el sustrato a través de Akt.

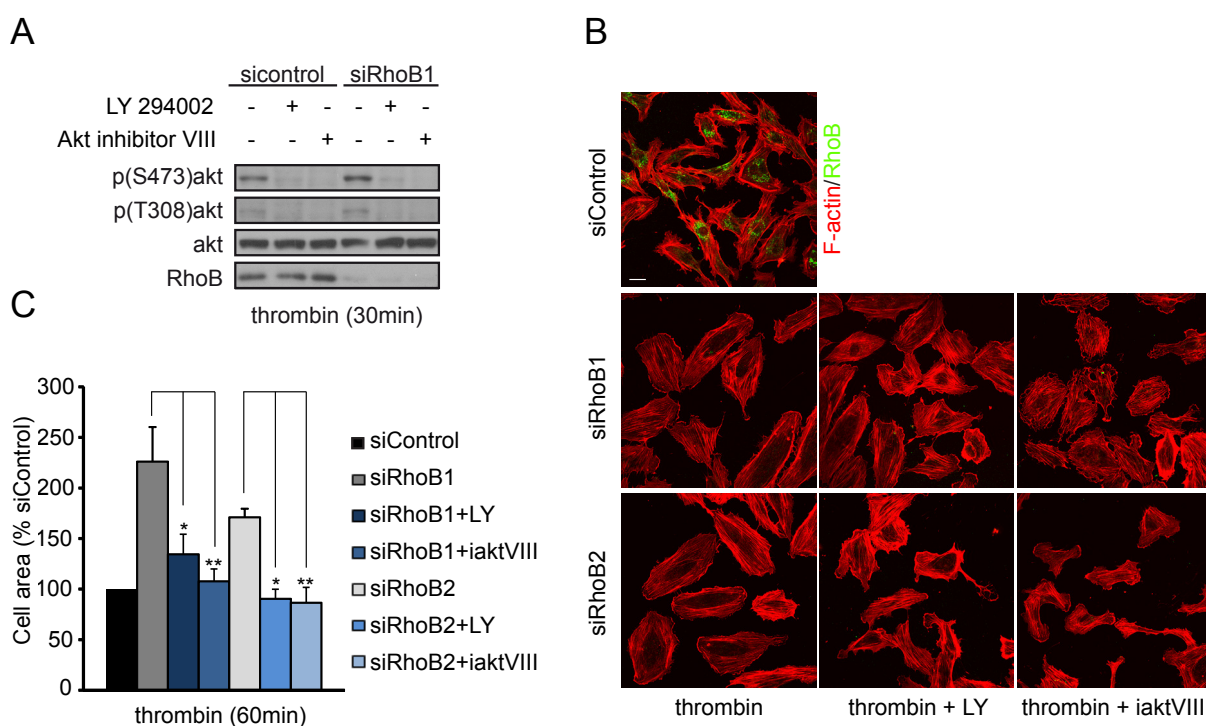


Figura 32. Akt regula la expansión de la célula endotelial sobre el sustrato. (A) Células HUVECs fueron transfectadas con siRNA y tratadas con TNF durante 7 horas. Se incubaron o no con los inhibidores LY294002 e inhibidor de Akt VIII durante 30 minutos y 1 hora respectivamente y después se estimularon con trombina durante 30 minutos. Fueron lisadas en presencia de inhibidores de fosfatasas y analizadas por inmunodetección con los anticuerpos indicados. (B) Células HUVECs procesadas como en A se estimularon con trombina durante 60 minutos. Fueron fijadas y teñidas para actina filamentosa y RhoB. Barra de escala=20µm. (C) El gráfico cuantifica el área de las células en B, expresada como el promedio + SEM de al menos 5 células por imagen, 10 imágenes por experimento de al menos tres experimentos independientes. *, p-valores<0.05; ** p-valores<0.005.

8.3. El efecto de RhoB sobre la restauración de la barrera endotelial es dependiente de la actividad de Akt

Para confirmar que RhoB actúa también a través de Akt para mediar la expansión de la célula, se estudió el efecto de la adición de los inhibidores LY y aktVIII sobre la resistencia transendotelial de la monocapa tras la estimulación con trombina mediante ECIS. La adición de LY294002 media hora antes de la estimulación provocó un aumento leve en la contracción máxima de las células endoteliales silenciadas para RhoB, mientras que canceló completamente la aceleración en el proceso de recuperación inducido por el silenciamiento de RhoB. En el caso del inhibidor de Akt VIII, la adición una hora antes de la estimulación con trombina no tuvo efecto sobre la contracción máxima, pero canceló completamente

la aceleración en el proceso de recuperación o incluso lo retrasó (Fig. 33). Estos resultados indican que RhoB regula la recuperación de la función de barrera tras la estimulación con trombina no sólo a través de Rac, sino también de Akt.

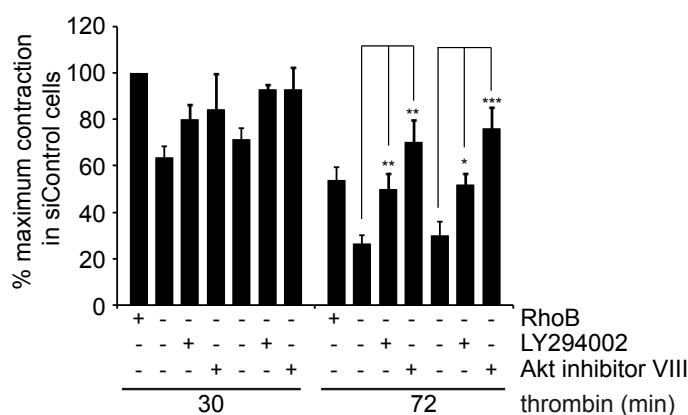


Figura 33. El efecto de RhoB sobre la restauración de la barrera endotelial es dependiente de la actividad de Akt. Células HUVECs fueron silenciadas para RhoB, estimuladas con TNF, tratadas con los inhibidores de la ruta PI3K-Akt cuando se indica y estimuladas con trombina. La TEER fue analizada con el ECIS y se representa en la gráfica en términos de porcentaje de contracción relativa a la máxima contracción de células control tras 30 minutos de la adición de trombina. Se muestra la media + SEM de al menos tres experimentos independientes. *, p-valor<0.05; ** p-valores<0.005, *** p-valor<0.0005.

8.4. Rac1 y Akt1 no se regulan mutuamente durante la extensión de las membranas endoteliales

Diversos autores han señalado la existencia de una regulación entre la vía de señalización PI3K-Akt y la GTPasa Rac. Se ha descrito que Rac activa Akt en linfocitos (Genot et al. 2000), que Rac regula la motilidad celular dependiente de Akt en fibroblastos estimulados por factores de crecimiento (Higuchi et al. 2001) o que la activación de Rac1 por interleuquina 2 media la activación de Akt en células *natural killers* (Jiang et al. 2003). Pero también que la PI3K media la activación de Rac1 para regular la función de barrera (Cain, Vanhaesebroeck, y Ridley 2010) o la transformación cancerígena de células pancreáticas (Wu et al. 2014). Para determinar si Akt y Rac estaban actuando dentro de la misma ruta de señalización para regular la recuperación de la función de barrera tras la contracción protrombótica o estaban regulando el proceso de manera independiente, se analizó la actividad de Rac1 en presencia del inhibidor de Akt. La adición del inhibidor de Akt VIII no tuvo ningún efecto sobre la actividad de Rac1, medida por *pull-down* a los tiempos de recuperación tras la contracción protrombótica (Fig. 34A). Del mismo modo, la adición del inhibidor de Rac 20 minutos después de la estimulación con trombina no tuvo efecto significativo sobre la fosforilación de Akt a los 72 minutos post-estimulación (Fig. 34B). Estos resultados apuntan a que Rac y Akt actúan en rutas paralelas de señalización controladas por RhoB para regular la expansión celular y la recuperación de la función de barrera.

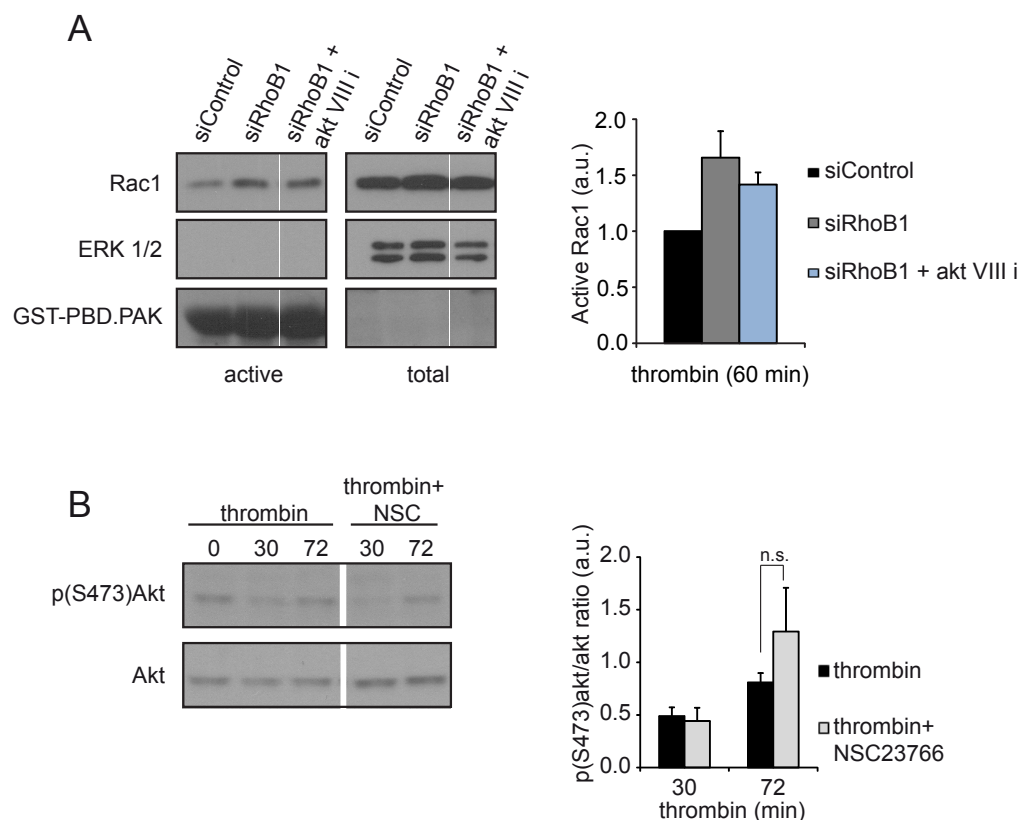


Figura 34. Rac1 y Akt1 actúan por vías de señalización independientes en el control de la extensión de las membranas endoteliales. (A) Ensayos de *pull-down* para determinar la actividad de Rac1 en células HUVECs previamente transfectadas con los siRNAs indicados, tratados con TNF durante 7 horas, con el inhibidor de Akt VIII durante 1 hora cuando se indica y estimuladas con trombina durante 60 minutos. La gráfica muestra los niveles de Rac1-GTP normalizados frente a los niveles totales de Rac1 como el promedio + SEM de dos experimentos independientes. (B) Células HUVECs fueron tratadas con TNF durante 7 horas y estimuladas con trombina durante los tiempos indicados. El inhibidor de Rac1 NSC23766 se añadió a los 20 minutos post-estimulación. Las células fueron lisadas y los niveles de fosforilación de Akt analizados por inmunodetección. La gráfica de la derecha muestra los niveles de fosforilación de Akt en Ser473 normalizados frente a los niveles totales de Akt. Se muestra el promedio + SEM de cuatro experimentos independientes. (n.s., no significativo).

8.5. RhoB no regula la maquinaria molecular que controla la actividad de Akt

Los mecanismos que regulan la actividad de Akt son bien conocidos. Para profundizar en la regulación de la fosforilación de Akt por parte de RhoB estudiamos si el silenciamiento de RhoB tenía algún efecto en la activación de la maquinaria que regula la actividad de Akt. En la ilustración 7 se resumen las vías de señalización que fueron analizadas.

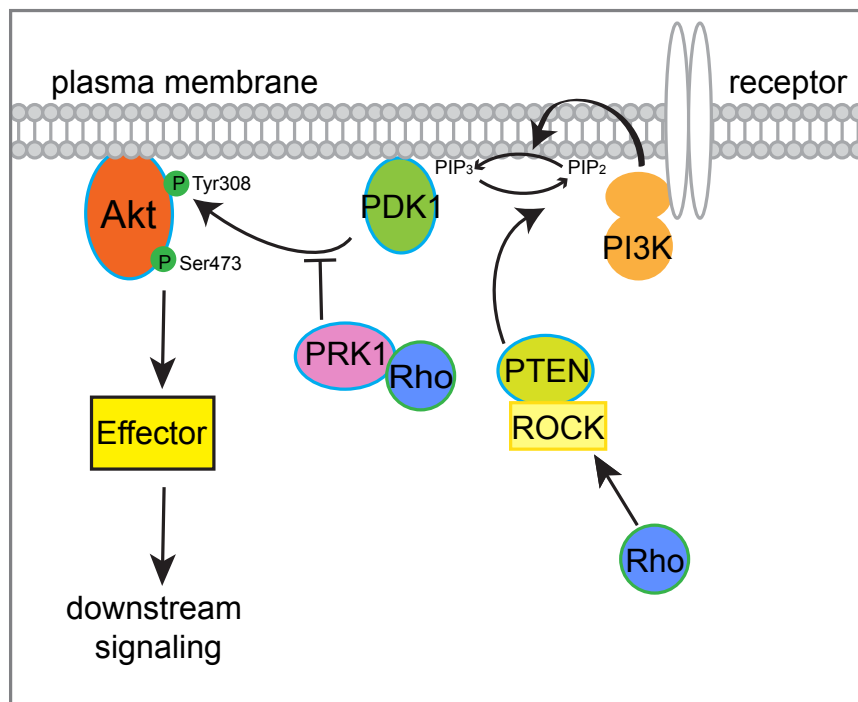


Ilustración 7. Esquema de las vías de señalización testadas que regulan la activación de Akt. Una vez activados, receptores de superficie reclutan y activan a la quinasa fosfatidilinositol 3 (PI3K). PI3K fosforila fosfatidinosítidos (PIP₂) de la membrana plasmática y genera fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP₃). Por el contrario, la fosfatasa PTEN realiza la función inversa y defosforila PIP₂ a PIP₃. La estabilidad y la actividad de PTEN depende de su interacción con la quinasa ROCK, que a su vez se activa por la acción de GTPasas de la subfamilia RhoA. PIP₃ es una molécula señalizadora, que recluta a la superficie celular a las quinasas PDK y Akt. Akt es activada por la fosforilación de las PDK en su dominio de activación (Thr308) y en su dominio funcional hidrofóbico (Ser473). Se ha descrito que la quinasa efectora de RhoB PRK1 inhibe la fosforilación de Akt inducida por PDK. Akt fosforilado es activo y desde su localización en la membrana plasmática es capaz de fosforilar y activar a sus efectores.

Previamente habíamos observado que la trombina induce una reducción en la fosforilación de Akt (Fig. 31), por lo que nos planteamos si RhoB podría estar regulando la actividad de la PI3K. En primer lugar, los ensayos de actividad de PI3K revelaron que la trombina inhibe la actividad de la quinasa, que es mínima tras 30 minutos de la estimulación con trombina (Fig. 35A). Esta cinética de actividad es concordante con los cambios en la fosforilación de Akt inducidos por trombina (Fig. 31). A la vista de estos resultados y habiendo observado que el silenciamiento de RhoB afecta a la fosforilación de Akt, realizamos ensayos de actividad de PI3K en células previamente silenciadas con dos siRNAs contra RhoB. El silenciamiento de RhoB no afectó a la actividad de la PI3K a los 30 minutos tras la estimulación con trombina (Fig. 35B), por lo que RhoB no afecta a la fosforilación de Akt a través de la regulación de la PI3K.

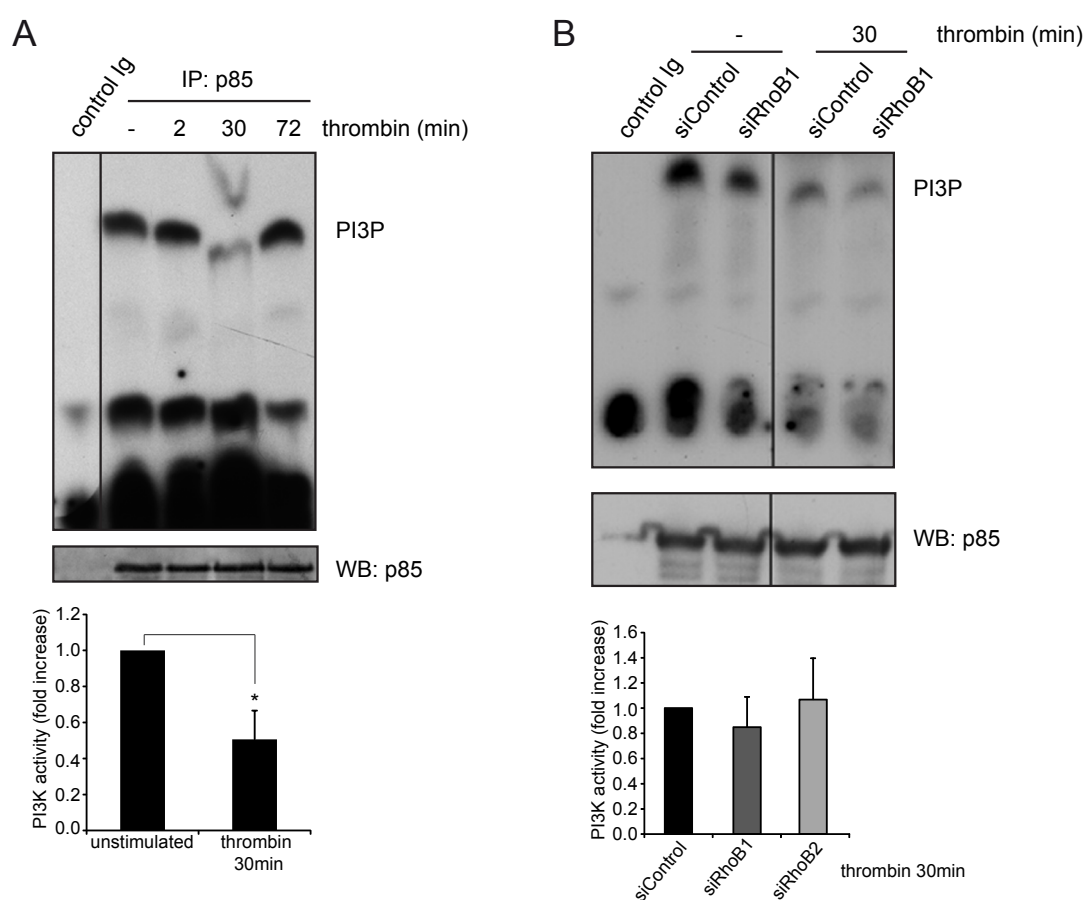


Figura 35. RhoB no regula la actividad de la PI3K. (A) Células HUVECs fueron estimuladas con TNF durante 7 horas, después con trombina durante los tiempos indicados y lisadas. La PI3K endógena fue inmunoprecipitada con un anticuerpo anti-p85 y su actividad determinada a través de una cromatografía en capa fina (TLC). La cantidad de PI3K total en los inmunoprecipitados se determinó a través de *western-blot* y se utilizó como control de la carga. El gráfico inferior muestra la media de la actividad de PI3K + SEM de tres experimentos independientes. * p-valor<0.05. (B) Células HUVECs fueron transfectadas con los siRNAs indicados y tratadas como en A. El gráfico inferior muestra la media de la actividad de PI3K + SEM tras 30 minutos de la estimulación con trombina en tres experimentos independientes.

Se ha descrito que ROCK interacciona con PTEN y es fundamental para regular su fosforilación y estabilidad (Vemula et al. 2010) y que RhoA regula a través de ROCK la actividad de la fosfatasa PTEN en leucocitos y células HEK293 (Zhong Li et al. 2005). La función de esta fosfatasa es antagónica a la de la PI3K, se encarga de la defosforilación de PIP3 incrementando el porcentaje de PIP2 en membrana, lo que reduce el reclutamiento de Akt y su activación. En primer lugar, determinamos el efecto de la inhibición de PTEN sobre la contracción inducida por trombina. Para ello, células HUVECs sembradas en placas de ECIS fueron tratadas con un inhibidor de PTEN media hora antes de la estimulación con trombina. Como era lo esperado, la inhibición de PTEN, que supone un aumento en la fosforilación de Akt (Fig. 36A), aceleró la recuperación de la función de barrera, aunque de manera modesta (Fig. 36B).

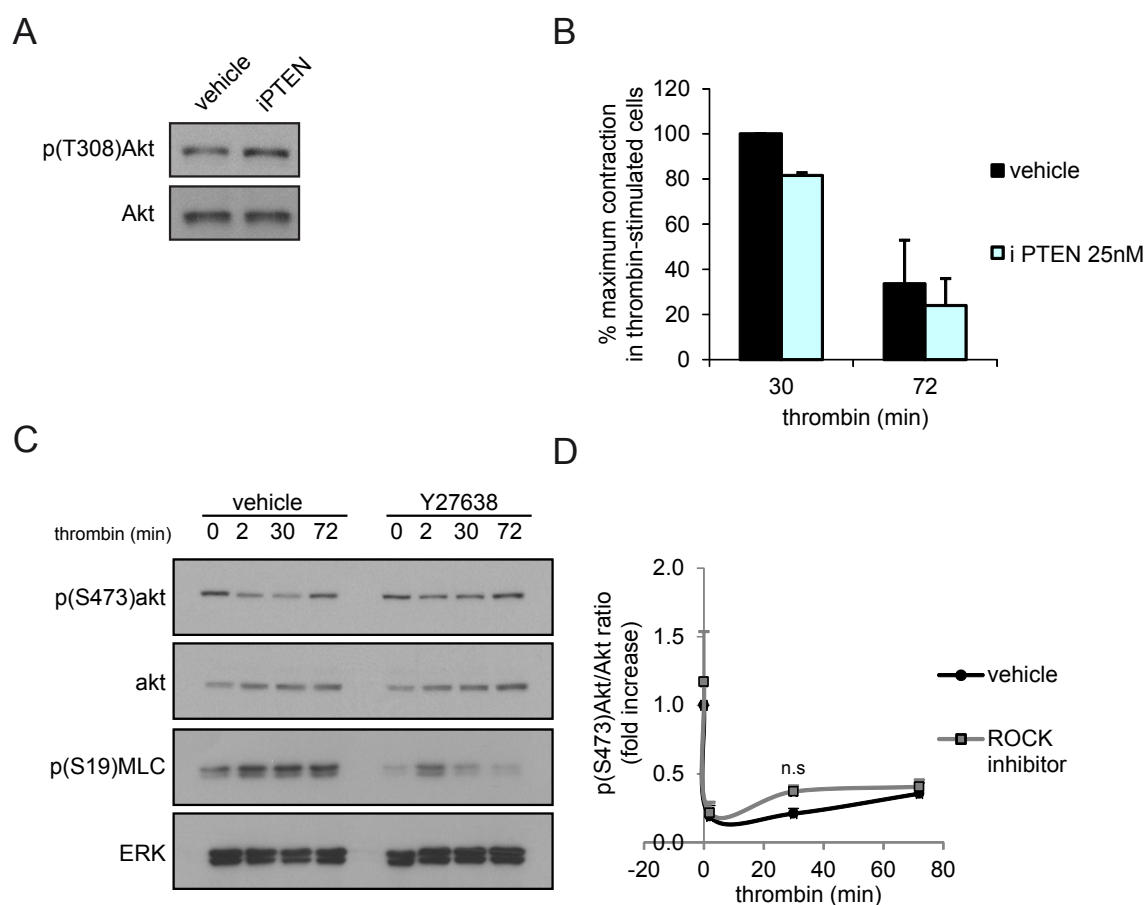


Figura 36. RhoB no regula la fosforilación de Akt a través de ROCK y PTEN. (A) Células HUVECs fueron tratadas con TNF durante 7 horas y estimuladas con trombina durante los tiempos indicados. El inhibidor de PTEN se añadió a 25nM 30 minutos antes de la estimulación con trombina. Las células fueron lisadas y los niveles de fosforilación de Akt analizados por inmunodetección. (B) El gráfico representa el efecto del inhibidor de PTEN en la TEER de células HUVECs estimuladas con trombina. Se muestra la media + SEM de tres experimentos independientes. (C) Células HUVECs fueron tratadas con TNF durante 7 horas y estimuladas con trombina durante los tiempos indicados. El inhibidor de ROCK Y27638 se añadió 30 minutos antes de la estimulación con trombina. Las células fueron lisadas y los niveles de fosforilación de Akt analizados por inmunodetección. (D) La gráfica de la derecha representa los niveles de fosforilación de Akt en Ser473 normalizados frente a los niveles totales de Akt. Se muestra el promedio + SEM de cuatro experimentos independientes. (n.s., no significativo).

Para estudiar si RhoB podría estar regulando la actividad de PTEN a través de su efector ROCK, como había sido previamente descrito para RhoA en otros tipos celulares, utilizamos el inhibidor de ROCK para tratar HUVECs estimuladas con trombina y observamos el efecto sobre la fosforilación de Akt. El inhibidor de ROCK tuvo un efecto sutil sobre la fosforilación de Akt 30 minutos después de la estimulación con trombina, que aumentó de manera no significativa y no tuvo efecto tras 72 minutos de estimulación (fig. 36C, D). Estos resultados sugieren que la regulación de PTEN a través del efector de las proteínas de la subfamilia Rho ROCK no se produce en nuestro modelo, aunque serían necesarios ensayos de actividad fosfatasa en células tratadas con siRNA contra RhoB para descartar una posible regulación de PTEN por parte de esta GTPasa por otros mecanismos.

La fosforilación de Akt se induce por la acción de las quinasas PDKs (Wick et al. 2000), que son reclutadas a la membrana plasmática por PIP3. Se ha descrito que RhoB promueve la localización de PDK en endosomas e interacciona con PDK1 en un complejo ternario junto con su efector PRK1 (Flynn et al. 2000). Además, PRK1 inhibe la fosforilación de Akt inducida por PDK (Wick et al. 2000). Estos datos previos nos llevaron a hipotetizar que RhoB podría estar regulando la fosforilación de Akt a través del control negativo de PDK por PRK1. Sin embargo, el silenciamiento de RhoB usando dos siRNAs contra RhoB distintos no tuvo efecto sobre la fosforilación de PRK1 y no solo no aumentó la fosforilación de PDK, sino que la disminuyó con uno de los dos siRNA mientras que no tuvo efecto con el otro. El silenciamiento de PRK1 no tuvo efecto sobre la fosforilación de PDK (fig. 37A, B). Este resultado sugiere que RhoB no regula la fosforilación de Akt a través de PDK.

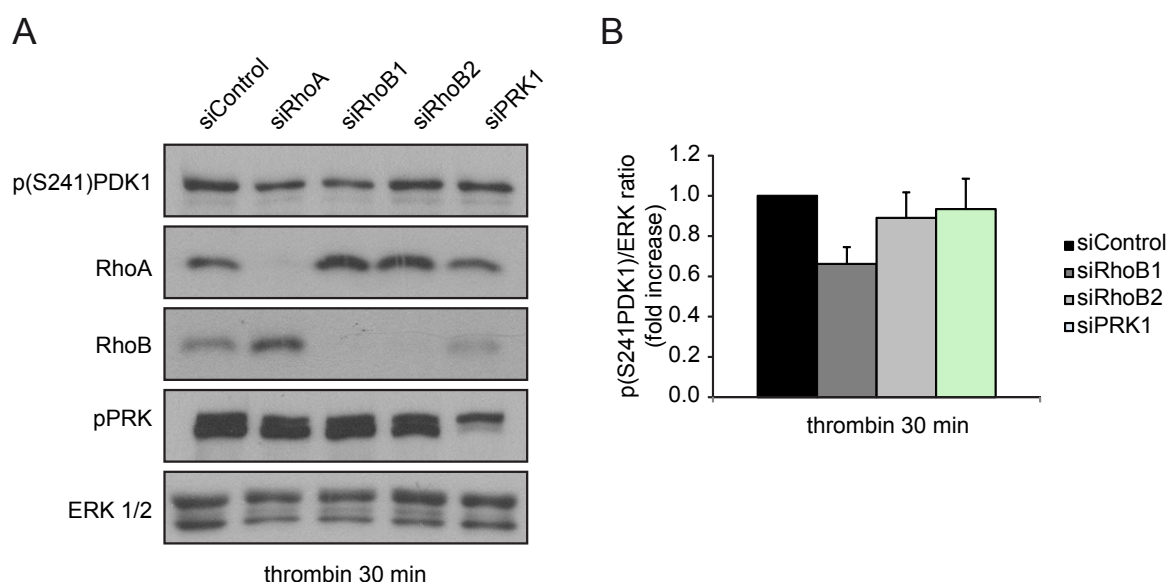


Figura 37. RhoB no regula la fosforilación de Akt a través de PDK1. (A) Células HUVECs fueron tratadas con los siRNAs indicados, estimuladas con TNF durante 7 horas y con trombina durante 30 minutos. Las células fueron lisadas y los niveles de fosforilación de PDK1 analizados por inmunodetección. El anticuerpo p(S241)PDK1 detecta los niveles de fosforilación de PDK1 en Ser241, residuo que se encuentra en el dominio de activación de la proteína. Una vez fosforilado, la proteína es activa. El anticuerpo pPRK detecta la fosforilación en los residuos Thr774 de PRK1 (banda inferior) y Thr816 de PRK2 (banda superior), situados en los dominios de activación de las respectivas proteínas y cuya fosforilación determina la activación de las mismas. (B) El gráfico muestra la fosforilación de PDK1 normalizada frente a los niveles de ERK 1/2 y expresada como la media +SEM de cinco experimentos independientes.

8.6. La sobreexpresión de RhoB cambia la localización subcelular de Akt

Se ha descrito que RhoB es fundamental para la estabilidad y el tráfico de Akt hacia el núcleo (Adini et al. 2003). Con este antecedente y habiendo demostrado que RhoB regula la localización de Rac (Fig. 24A, B), hipotetizamos que RhoB podría también regular la localización de Akt y por tanto su funcionalidad. Para testarlo, células HUVECs fueron transfectadas con una construcción de Akt1 unida al epítipo HA. Observamos que la

mayor parte de la proteína se localiza dispersa en el citosol, pero también un porcentaje de las células presentaba Akt en la membrana plasmática y en el núcleo. La transfección conjunta de HA-Akt y RhoB-GFP reclutó a Akt a un compartimento vesicular perinuclear, pudiéndose encontrar ambas proteínas en vesículas con actina (Fig. 38, zoom 1, puntas de flecha). Además, también se observó colocalización de RhoB y Akt1 en vesículas dispersas y cercanas al borde celular, en zonas de alta polimerización de actina (Fig. 38, zoom 2). Estos resultados sugieren que, al igual que lo observado para Rac1, RhoB regularía la localización subcelular de Akt, de tal forma que induciría su retención en endosomas haciendo que Akt no estuviera accesible a sus activadores y efectores.

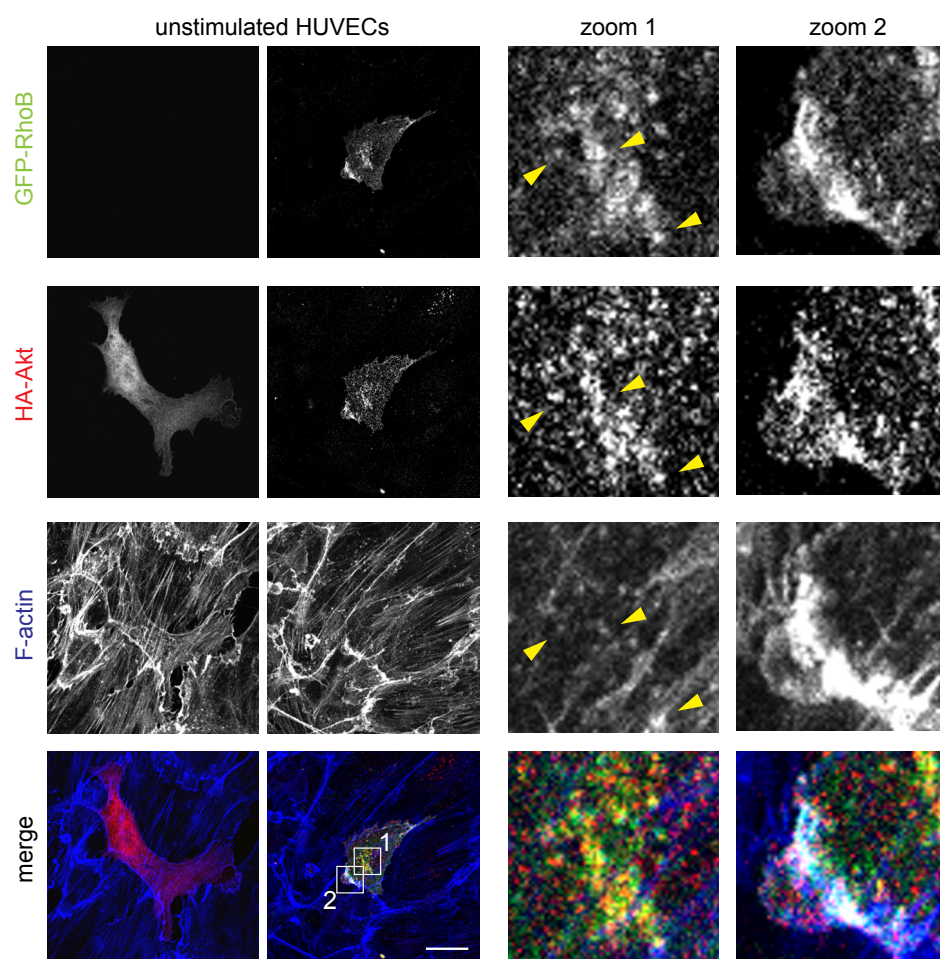


Figura 38. La sobreexpresión de RhoB altera la localización subcelular de Akt. Células HUVECs no estimuladas expresando HA-Akt o HA-Akt y GFP-RhoB durante 48 horas fueron fijadas y teñidas para actina filamentosa y el epítipo HA. Los zooms de la derecha muestran ampliaciones de las áreas recuadradas en la célula transfectada con ambas construcciones. RhoB y Akt colocalizan en vesículas ricas en actina (puntas de flecha). Barra de escala=20µm.

DISCUSIÓN



1. RhoA, RhoB y RhoC en la regulación de la permeabilidad en respuesta a TNF

La citoquina TNF es clave durante la respuesta inflamatoria, pues su acción coordinada sobre distintos tipos celulares media y regula todo el proceso (Bradley 2008). En el caso de las células endoteliales, induce un aumento de la permeabilidad modificando la activación o expresión proteica. Numerosos estudios han implicado a las Rho GTPasas en la señalización intracelular inducida por esta citoquina (Wójciak-Stothard et al. 1998; Wójciak-Stothard et al. 2001; Wójciak-Stothard y Ridley 2002). El estudio de la contribución individual de cada proteína Rho en la respuesta inflamatoria es clave, pues la subfamilia Rho regula efectores comunes que son dianas terapéuticas potenciales para el tratamiento de enfermedades con componente inflamatorio y que presentan la función de barrera celular comprometida (Shibuya et al. 2005; Shi y Wei 2013).

1.1. RhoB, pero no RhoA o RhoC, aumenta su expresión en respuesta a TNF

RhoA, RhoB y RhoC presentan una secuencia aminoacídica idéntica en el 85%, aunque han sido descritas diferencias en cuanto a su localización subcelular, regulación de su activación e interacción con proteínas efectoras que sugieren que sus funciones celulares podrían ser distintas. En la búsqueda de nuevas moléculas reguladoras y con el objetivo de analizar la contribución de cada proteína Rho al proceso inflamatorio, nuestros estudios han evidenciado que TNF induce un aumento de la expresión de RhoB de unas cinco veces en comparación con células endoteliales no inflamadas, mientras que IL-1 aumenta la expresión unas 3 veces, en consonancia con lo previamente observado (Kroon et al. 2013). Pero además, nuestros resultados revelan que este hecho es específico de RhoB, pues TNF no induce cambios significativos en la transcripción de RhoA e induce cambios en RhoC de forma moderada. Además, la inducción de RhoB no es exclusiva de células endoteliales derivadas de cordón umbilical, sino que también ocurre en células microvasculares de la dermis humana, en líneas celulares endoteliales y, en menor medida, en células epiteliales. Por otro lado, los análisis por inmunohistoquímica de muestras de tejidos humanos sugieren que la expresión de RhoB también se ve incrementada durante la inflamación *in vivo*. En células en cultivo, la expresión de RhoB, pero no de RhoA y RhoC se induce en respuesta a una gran variedad de estímulos, como la luz ultravioleta, otras citoquinas y factores de crecimiento (Croft y Olson 2011), mientras que el transcrito de RhoB tiene un tiempo de vida media corto en comparación con el de RhoA y RhoC (Zalcman et al. 1995). Este patrón de expresión tan regulado sugiere que la proteína ejerce funciones específicas en determinados procesos celulares.

Entre nuestros resultados se incluye además un análisis de los niveles relativos de expresión de las tres proteínas entre sí. Según esta cuantificación, en células no inflamadas RhoB se expresa minoritariamente, mientras que el estímulo inflamatorio induce el aumento en la expresión de RhoB a niveles comparables con los de RhoA y RhoC. La activación de estas tres GTPasas es también similar, de tal forma que en inflamación el número de moléculas activas de RhoB en la célula es similar a los de RhoA y RhoC en condiciones de inflamación inducida por TNF. Este resultado apunta a que cualquier función específica de RhoB en el proceso inflamatorio no puede atribuirse a una concentración superior de RhoB frente a RhoA y RhoC como consecuencia del aumento de expresión inducido por TNF.

Por otro lado, hemos observado que el silenciamiento de RhoB o RhoC induce un aumento de la expresión de RhoA y el silenciamiento de RhoA provoca un aumento en la expresión de RhoB (Fig. 10A). Esta observación está en consonancia con lo observado por otros autores. Se ha descrito que el silenciamiento de RhoA induce un aumento de la expresión de RhoB en varios tipos celulares (Ho et al. 2008) y que en células de cáncer de próstata el silenciamiento de RhoA y en menor medida el de RhoC aumenta la expresión de RhoB, aunque el silenciamiento de RhoB no tiene efecto sobre la expresión de RhoA o RhoC (Vega et al. 2011). Estos datos indican que entre los miembros de la subfamilia RhoA existe una regulación de sus niveles de expresión entre sí. Aunque nosotros no hemos profundizado en el posible mecanismo molecular que media esta regulación en nuestro modelo, se ha descrito que en células de tumor de pecho la disponibilidad del GDI RhoGDI α es responsable de este efecto. Se ha sugerido que la interacción con GDIs no solo regula la activación de las Rho GTPasas, sino que también las protege de la degradación (Rolli-Derkinderen et al. 2005). Dado que el número de moléculas de RhoGDI α es limitado, el silenciamiento de RhoA aumenta la proporción de moléculas de RhoGDI α que interacciona con moléculas de RhoB, lo que inhibe su degradación, estabiliza a la GTPasa y aumenta sus niveles en la célula (Ho et al. 2008).

1.2. Regulación conjunta de la señalización en respuesta a TNF

Hasta el surgimiento de la tecnología del RNA interferente al final de la década de los 90 (Fire et al. 1998), los estudios de la función de las proteínas de la subfamilia Rho en diversos procesos celulares se llevaron a cabo por métodos que impedían discernir entre las tres proteínas, como la exoenzima C3 transferasa de la bacteria *Clostridium botulinum* que tiene como diana a las tres proteínas y las inhibe por adición de un residuo ADP-ribosa o el inhibidor del efector común de las tres, la quinasa ROCK (Wojciak-Stothard y Ridley 2002; Birukova et al. 2004; Wheeler y Ridley 2007). En esta memoria hemos utilizado siRNA para inhibir específicamente cada proteína de la subfamilia Rho y estudiar su papel individual en la respuesta inflamatoria. Estrategias similares han revelado papeles diferenciales y específicos de cada una de estas proteínas en la migración celular (Vega et al. 2011). Tanto en reposo como en condiciones inflamadas, el silenciamiento individualizado o en conjunto nos ha permitido concluir que las proteínas de la subfamilia Rho presentan papeles redundantes en la regulación de la polimerización de actina. Este efecto está en consonancia con estudios previos que demuestran que fibroblastos extraídos del ratón deficiente de RhoA o de RhoC no presentan cambios aparentes en las fibras de estrés, cómo tampoco aquellos extraídos del ratón deficiente de RhoA/RhoC. Sin embargo, el silenciamiento de RhoB en células del ratón deficiente de RhoA/RhoC afecta drásticamente al contenido de actina filamentosa (Melendez et al. 2011), así como el tratamiento de células endoteliales con la exoenzima C3 transferasa (Carbajal y Schaeffer 1999). Al contrario, la expresión de mutantes constitutivamente activos de cada Rho GTPasa de manera individual en fibroblastos induce fibras de estrés en todos los casos (Wang et al. 2003; Aspenström, Fransson, y Saras 2004).

La estrategia del RNA de interferencia nos ha permitido concluir que los papeles de las proteínas de la subfamilia Rho son aditivos en la regulación de la permeabilidad basal. En este caso, el efecto del silenciamiento de las tres proteínas simultáneamente mediante el uso de siRNA tiene un efecto contrario comparado con el tratamiento con C3 transferasa en

células endoteliales, pues en el primer caso se produce un aumento de la permeabilidad basal mientras que en el segundo se reduce (Carbajal y Schaeffer 1999). Esto puede ser debido en parte al tipo celular analizado en cada experimento. En el laboratorio hemos comprobado que la incubación de HUVECs con C3 transferasa reduce la función constitutiva de barrera endotelial, de forma similar al triple silenciamiento de las tres Rho GTPasas (Ortega y Millán, datos no publicados). Esta familia por tanto podría jugar un doble papel de mantenimiento de la barrera endotelial en ausencia de estímulo y de fomento de la contracción mediada por actomiosina. El aumento de la permeabilidad en el caso del triple silenciamiento génico podría también deberse a defectos en la formación de la monocapa endotelial debidos a la implicación de las Rho GTPasas en el crecimiento y la división celular (Olson, Ashworth, y Hall 1995; Zalcman et al. 1995; Melendez et al. 2011; Chircop 2014). El triple silenciamiento de las tres Rho GTPasas en HUVECs reduce de hecho drásticamente el crecimiento celular (Barroso y Millán, datos no publicados).

En cuanto al aumento de permeabilidad endotelial inducido por TNF, el silenciamiento individual de cada GTPasa no tuvo efecto sobre el proceso, mientras que el efecto del tripe silenciamiento no pudo ser testado al presentar un efecto en la permeabilidad basal. Sin embargo, los experimentos previos en los que se ha utilizado el inhibidor de ROCK sugieren también que las Rho GTPasas de la subfamilia RhoA no están implicadas en el aumento de permeabilidad inducido por TNF (McKenzie y Ridley 2007; Fernández-Martín et al. 2012; Marcos-Ramiro, García-Weber, y Millán 2014).

2. Regulación específica de RhoB de la contracción endotelial protrombótica

Durante la respuesta inflamatoria, la acción persistente de las citoquinas y las células inmunitarias sobre el endotelio genera daño vascular que resulta en la liberación de señales procoagulantes. La acción de la trombina sobre el endotelio induce hiperpermeabilidad como consecuencia de cambios profundos en la estructura del citoesqueleto de actina.

2.1. RhoB no regula la contracción inducida por trombina pero sí la recuperación de la función de barrera

La trombina induce una contracción brusca, transitoria y local del endotelio que va seguida de un proceso de recuperación gradual de la función de barrera. Nuestros resultados indican que RhoA, RhoB y RhoC juegan papeles redundantes en el proceso de contracción, pues su silenciamiento individual no tiene efecto mientras que el silenciamiento conjunto la inhibe. Este resultado está en consonancia con datos previos en los que la contracción endotelial protrombótica se ve parcialmente inhibida por la adición del inhibidor de la quinasa ROCK (Komarova, Mehta, y Malik 2007; Fernández-Martín et al. 2012) o de la exoenzima C3 transferasa (Carbajal y Schaeffer 1999). La contracción aguda protrombótica de las células endoteliales requiere la formación de fibras de estrés. Nuestros resultados indican que RhoA regula mayoritariamente la activación de la miosina, mientras que el silenciamiento de RhoB tiene un efecto menor sobre la fosforilación de MLC. Sin embargo, estudios previos muestran que la adición de C3 transferasa en células endoteliales inhibe completamente la formación de fibras de estrés y el alineamiento de la miosina con la

actina en respuesta a trombina (Carbajal y Schaeffer 1999), que fibroblastos derivados del ratón deficiente condicional de RhoA no presenten alteraciones de las fibras de estrés en respuesta a estímulos (Melendez et al. 2011), que el silenciamiento de RhoB en células epiteliales reduce el número, grosor y longitud de las fibras de estrés (Bousquet et al. 2009) y que el silenciamiento simultáneo de RhoA o de RhoA y RhoC no inhibe completamente la formación de las fibras de estrés (Ho et al. 2008), lo que parece indicar un papel aditivo de las tres proteínas en la formación de fibras de estrés.

La subfamilia Rho también parece tener un papel aditivo en la regulación de las adhesiones focales. Nuestros datos indican que RhoA y RhoB regulan conjuntamente la fosforilación de paxilina. Este resultado está de acuerdo con otro estudio que ha mostrado que el silenciamiento de RhoB reduce el marcaje de vinculina, otra proteína asociada a las adhesiones focales, aunque no estudian la contribución de RhoA y RhoC al proceso (Bousquet et al. 2009), mientras que las células silenciadas para RhoB presentan menos adhesiones focales inducidas por la expansión de la célula sobre el sustrato en comparación con las células control (Vega et al. 2012). Además, la adición de C3 transferasa a células endoteliales inhibe la formación de contactos focales en ensayos de migración (Aepfelbacher et al. 1997) y la expresión de mutantes constitutivamente activos de cada Rho genera adhesiones focales de tamaño prominente (Aspenström, Fransson, y Saras 2004).

Los resultados anteriores son un buen ejemplo de procesos celulares en los que RhoA, RhoB y RhoC presentan funciones compensatorias. En cambio, hemos encontrado una función novedosa y específica de RhoB en el proceso de recuperación, que no se ve afectado tras el silenciamiento de RhoA o RhoC, pero que se ve claramente acelerado por el silenciamiento de RhoB.

2.2. Papel del lamelipodio en la recuperación de la función de barrera

La resolución del evento de contracción inducido por trombina en el endotelio requiere de la reformación de la monocapa endotelial y el reestablecimiento de las uniones intercelulares. Nuestros resultados indican que RhoB no está implicada en la reformación o el mantenimiento de las uniones adherentes. En otro contexto, se ha descrito que el silenciamiento de RhoB reduce la adhesión célula-célula y los niveles de E-cadherina en células de cáncer de próstata (Vega et al. 2015), mientras que el aumento de expresión del microRNA miR-21 en células de la mucosa intestinal desorganiza las uniones estrechas a través de la inducción de la degradación de RhoB (Y. Yang et al. 2013). El papel diferencial de RhoB en función del contexto celular ya ha sido señalado en más ocasiones. Se ha reportado que RhoB presenta funciones antagónicas en células tumorales y las células del estroma que rodean al tumor. En las células tumorales RhoB funcionaría como un supresor de tumores al inhibir la localización del receptor de EGF en la membrana plasmática y la señalización por Akt, mientras que funcionaría como un promotor de tumores al sostener la señalización por Akt en el endotelio, lo que induciría la angiogénesis de las células endoteliales del estroma para vascularizar el tumor (Kazerounian et al. 2013). Estos mismos autores demuestran que en ratones deficientes de RhoB la angiogénesis en respuesta a isquemia en la retina o daño cutáneo está reducida, mientras que la linfangiogénesis por daño cutáneo e inflamación está incrementada (Gerald et al. 2013).

Es evidente que para la recuperación de la monocapa endotelial, la reexpansión de las células sobre el sustrato que les permite re-contactar entre sí es fundamental. Algunos autores han señalado que la recuperación de la función de barrera tras la acción de agentes que incrementan la permeabilidad implica un proceso poco conocido de cierre de los huecos, que aparecen en la monocapa como consecuencia de la contracción, a través de la polimerización de actina en la periferia celular. Este proceso media la aparición de estructuras de tipo lamelipodio en los espacios paracelulares entre células endoteliales adyacentes. Se produce además la reorganización del anillo de actina cortical y el anclaje de los componentes de las uniones intercelulares a éste, ambos elementos claves para el mantenimiento de las células fuertemente adhesionadas entre sí, que es lo que determina la función de barrera. Diversos agentes que refuerzan la función de barrera actúan a través de este mecanismo, como la esfingosina-1-fosfato (S1P) (McVerry y Garcia 2004; McVerry et al. 2004), los fosfolípidos oxidados (Birukov et al. 2004), el factor de crecimiento de hepatocitos (F. Liu et al. 2002), la proteína activada C (APC) (Finigan et al. 2005) o nucleótidos extracelulares como el ATP (J. R. Jacobson y Garcia 2007). De hecho recientemente se ha señalado que existe una conexión entre la maduración de las uniones intercelulares y el lamelipodio. En estadios iniciales de la formación de la barrera endotelial, las áreas de contacto entre dos células que todavía no han sido ocupadas por las uniones intercelulares emiten lamelipodios circulares que favorecen la formación de uniones adherentes (Abu Taha et al. 2014). Además se ha descrito que, una vez alcanzada la confluencia, las células endoteliales generan lamelipodios con frecuencia y de manera local y que estos lamelipodios son importantes para los cambios dinámicos de la permeabilidad en el endotelio (Breslin et al. 2015). En el mismo sentido, nuestros resultados demuestran que este proceso también ocurre y es crítico en la recuperación de la función de barrera tras la contracción mediada por trombina y que RhoB tiene una función fundamental en la regulación del mismo. Parece ser que la implicación de RhoB en la regulación del lamelipodio no es exclusiva de células endoteliales, ya que el silenciamiento de RhoB en células epiteliales de cáncer de pulmón induce la polimerización de estructuras de actina en la periferia celular similares al lamelipodio (Bousquet et al. 2009) y RhoB, junto con RhoA, está implicado en la reabsorción del lamelipodio en macrófagos de ratón (Königs et al. 2014).

El papel de RhoB en la adhesión y migración celular empieza a ser conocido. Diversos estudios señalan que el silenciamiento de RhoB reduce la adhesión de macrófagos, células epiteliales de pulmón y células de cáncer de próstata (Wheeler y Ridley 2007; Bousquet et al. 2009; Vega et al. 2012; Alfano et al. 2012). El silenciamiento de RhoB también induce un aumento en la capacidad migratoria de macrófagos y células epiteliales de pulmón (Wheeler y Ridley 2007; Bousquet et al. 2009), aunque su papel en la migración de células de cáncer de próstata es controvertido. El silenciamiento de RhoB aumenta la velocidad de migración de células de cáncer de próstata en subconfluencia (Vega et al. 2012; Vega et al. 2015) mientras que la reduce en estas mismas células en respuesta a uroquinasa (uPa) (Alfano et al. 2012). En cuanto a la expansión de la célula sobre el sustrato, el silenciamiento de RhoB reduce la expansión e induce un fenotipo redondeado de macrófagos y células de cáncer de próstata (Wheeler y Ridley 2007; Vega et al. 2012; Alfano et al. 2012). En nuestro caso, no hemos analizado ni la capacidad migratoria ni la adhesión de células endoteliales carentes de RhoB, aunque la expansión de las células endoteliales sobre el sustrato está aumentada. Por último, aunque el silenciamiento de RhoB en dos líneas distintas de células epiteliales de pulmón aumenta la capacidad migratoria de ambas, provoca distintos fenotipos en la morfología y el citoesqueleto de actina de las dos líneas celulares. Reduce significativamente

el número, longitud y grosor de las fibras de estrés en un tipo celular, mientras que induce la polimerización de actina en la periferia celular y la formación de lamelipodios en el otro tipo (Bousquet et al. 2009). Este último fenotipo es consistente con el observado por nosotros en células endoteliales. A la vista de estos resultados y del papel diferencial de RhoB en función del tipo celular que se ha mencionado al comienzo de este apartado, se puede concluir que la función de RhoB está altamente especializada y que varía en función del proceso, el tipo celular y el estímulo.

2.3. La localización regula la función: RhoB dirige la formación del lamelipodio a través de Rac y Akt

Así pues, la polimerización de actina cortical y la formación de extensiones de membrana parecen ser eventos claves en la recuperación de la función de barrera. Nuestros resultados indican que RhoB regula este proceso controlando la localización de maquinaria proteica clásicamente implicada en la formación del lamelipodio, sugiriendo una similitud entre los mecanismos que controlan la recuperación de la función de barrera y aquellos que regulan la migración celular.

Se ha descrito que la activación de la GTPasa Rac que dirige la remodelación de la actina cortical y la formación del lamelipodio ocurre en respuesta a estímulos agonistas de la función de barrera, como fosfolípidos oxidados (Birukov et al. 2004), APC (Finigan et al. 2005), S1P (Liu et al. 2002; Tauseef et al. 2008), ATP (Jeffrey R. Jacobson et al. 2006), AMPc (Schlegel y Waschke 2014) o HGF (F. Liu et al. 2002). ATP induce la translocación de Rac a la periferia celular (Jeffrey R. Jacobson et al. 2006). Así mismo, HGF induce la translocación de Rac1 desde un compartimento endosomal hasta la membrana plasmática (Palamidessi et al. 2008) y la estimulación de células endoteliales con HGF acelera la recuperación de la función de barrera (Fig. 28B y Birukova et al. 2007). Estos datos concuerdan con los nuestros correlacionando la distribución de Rac1 en la periferia con la recuperación de la función de barrera celular y la extensión de lamelipodios bajo el control de RhoB. Se ha descrito que RhoB regula la actividad de Rac negativamente en la invasión de células de cáncer de pulmón (Bousquet et al. 2009) y positivamente en respuesta a PDGF (Minzhou Huang et al. 2011). Se ha demostrado que la recuperación de la función de barrera tras la contracción protrombótica es regulada por la activación de Rac1 (Aslam et al. 2014). RhoB favorece la contracción protrombótica al mediar la retención de Rac en endosomas. De esta forma, la localización de Rac en la membrana plasmática, desde donde es capaz de activar a sus efectores y regular la polimerización de actina cortical y la formación de lamelipodios, se reduce y por lo tanto se retrasa la expansión de la célula endotelial sobre el sustrato y la recuperación de la integridad de la monocapa.

La proliferación y la migración de las células endoteliales están reguladas por la activación de Rac en conjunción con eventos de fosforilación mediados por Akt. Akt ha sido implicado en la regulación de la migración endotelial en respuesta a VEGF y S1P (Morales-Ruiz et al. 2000; Chavakis et al. 2001; Morales-Ruiz et al. 2001). Estudios en otros tipos celulares también han implicado a la vía PI3K-Akt en la migración direccional y la quimiotaxis (Sasaki et al. 2000; Z. Li et al. 2000). Se ha descrito que Akt se localiza transitoriamente en el frente de avance de células en migración (Meili et al. 1999; Servant et al. 2000; Higuchi et al. 2001) y que regula la formación del lamelipodio a través de sus efectores girdina y PAK (Enomoto et al. 2005; Somanath y Byzova 2009). Además, Akt ha sido implicado en la regulación de

la permeabilidad endotelial. El fortalecimiento de la función de barrera inducido por el hialuronano de alto peso molecular se produce a través de la fosforilación del receptor de S1P por Akt (Singleton et al. 2006), mientras que Akt1 regula la permeabilidad vascular *in vivo* (J. Chen et al. 2005; Di Lorenzo et al. 2009). Los resultados presentados en esta memoria indican que Akt incrementa la expansión de la célula endotelial sobre el sustrato tras la contracción inducida por trombina y que el efecto de RhoB sobre la recuperación de la función de barrera se produce también a través de Akt.

RhoB ha sido previamente implicado en la inhibición de la activación de Akt en invasión en células de cáncer de pulmón (Bousquet et al. 2009), en células pancreáticas en respuesta al factor de crecimiento insulínico (IGF-1) (Z. Chen et al. 2000) y en fibroblastos en respuesta a sobreexpresión de Ras o suero (Mazières et al. 2005). Sin embargo, también se ha reportado que RhoB induce la activación de Akt en células de cáncer de próstata durante la migración celular en respuesta a uroquinasa (uPa) (Alfano et al. 2012). El papel dual de RhoB en la regulación de Akt en función del proceso y el tipo celular se hace evidente en el artículo ya mencionado en el que los autores describen que RhoB regula Akt positivamente en el crecimiento de células tumorales pero negativamente en las células endoteliales del entorno del tumor encargadas de la vascularización del mismo en cáncer de pecho (Kazerounian et al. 2013). Además, RhoB regula los niveles y el tráfico de Akt en desarrollo vascular (Adini et al. 2003). Nuestros resultados indican que el silenciamiento de RhoB aumenta la activación de Akt. Esto no se debe a la regulación por parte de RhoB de moléculas implicadas en la activación de Akt, como PI3K, PDK, PTEN (figuras 35, 36 y 37), sino que probablemente se deba al control de la localización de Akt en un compartimento endosomal, puesto que la sobreexpresión de RhoB-V14 parece retener a Akt en endosomas concentrados en la región perinuclear. En células no estimuladas, Akt se localiza en el citoplasma, fundamentalmente concentrado en los márgenes del núcleo (Adini et al. 2003) y con los dos residuos que determinan su actividad (Ser473 y Thr308) desfosforilados. En células activadas, los fosfolípidos de membrana productos de la quinasa PI3K inducen el reclutamiento de Akt a la membrana plasmática, donde la proteína se ancla a través de su dominio PH y es secuencialmente fosforilada, adoptando una conformación completamente activa para fosforilar a sus efectores (Hemmings 1997; Shiojima y Walsh 2002). Estos antecedentes y nuestros resultados sugieren que, de manera similar a su acción sobre Rac, RhoB reduce la localización de Akt en la membrana plasmática y favorece la localización de la quinasa en endosomas, lo que interfiere con la formación del lamelipodio inducida por Akt y favorece el mantenimiento de la contracción en detrimento de la recuperación de la función de barrera.

Numerosos estudios sugieren la existencia de una regulación entre la GTPasa Rac y la quinasa Akt. Mientras que se ha descrito que Akt inhibe Rac al fosforilarla e inhibir su unión a GTP (Kwon et al. 2000), otros autores demuestran que Akt fosforila el receptor de S1P e induce la activación de Rac y la migración en células endoteliales (Lee et al. 2001). Otros estudios revelan que Rac y Cdc42 inducen la señalización por Akt (Genot et al. 2000; Djouder et al. 2001) y la migración celular a través de esta quinasa (Higuchi et al. 2001). En nuestro caso, los resultados sugieren que no existe una regulación entre Rac y Akt durante la recuperación de la función de barrera tras la estimulación con trombina y que RhoB regula su localización subcelular de manera independiente. Sin embargo, necesitaríamos realizar más experimentos silenciando específicamente la familia Rac y Akt para validar nuestros resultados obtenidos con inhibidores farmacológicos.

RhoB fue el primer miembro de la familia de las Rho GTPasas que se localizó en endosomas (Adamson, Paterson, y Hall 1992) y existen numerosas evidencias que demuestran que esta GTPasa regula el tráfico intracelular. RhoB ha sido implicado en la regulación del tráfico del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Gampel, Parker, y Mellor 1999), del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Minzhou Huang et al. 2007), del receptor de TNF (Kroon et al. 2013) y de la quinasa Src (Sandilands et al. 2004). Los datos mostrados en esta memoria sobre el efecto de inhibidores del tráfico intracelular en la regeneración de la monocapa evidencian la importancia de este proceso y de la correcta localización de la maquinaria que dirige la expansión celular, la polimerización de actina cortical y formación del lamelipodio y la reorganización de las uniones intercelulares en la recuperación de la función de barrera. RhoB ha sido propuesto como un regulador del tráfico endosomal a través de sus efectores las forminas mDia1 (Watanabe et al. 1999; Fernandez-Borja et al. 2005) y mDia2 (Wallar et al. 2007). Estas proteínas son capaces de polimerizar actina alrededor de los endosomas, lo que induce el anclaje de estos a los filamentos de actina (Fernandez-Borja et al. 2005). Además, el tráfico y la localización vesicular de estas dos forminas dependen de RhoB. Por otro lado, los mutantes constitutivamente activos de RhoB o mDia reducen la velocidad de las vesículas del receptor de EGF y del receptor de transferrina tras su internalización, probablemente por un incremento en la asociación de estas vesículas con los filamentos de actina (Fernandez-Borja et al. 2005; Wallar et al. 2007). Todos estos datos previos unidos a nuestros propios resultados nos llevan a hipotetizar que RhoB podría retener en endosomas y reducir el reciclaje de Rac y Akt a la membrana plasmática mediante la polimerización de actina alrededor de los endosomas que los contienen mediante mDia, lo que provocaría la asociación de estas vesículas con los filamentos de actina.

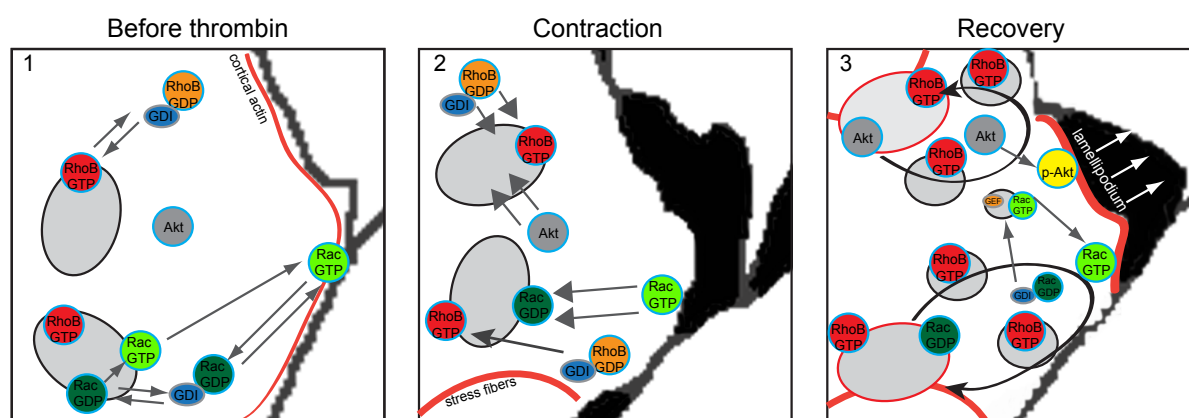


Ilustración 8. Modelo de la regulación del tráfico intracelular de Rac1 y Akt por RhoB. En células estimuladas con TNF, Rac1 cicla entre vesículas positivas para RhoB y la membrana plasmática, donde se encarga del mantenimiento de las uniones intercelulares. Akt se localiza mayormente en el citosol y en regiones de membrana discretas (1). Tras la estimulación con trombina, la actividad de Rac1 y Akt se reduce y ambas proteínas son internalizadas, mientras que RhoB se activa (2). Durante la recuperación, es necesaria la relocalización de Rac1 y Akt en la membrana plasmática para inducir la polimerización de actina en el lamelipodio y la extensión de la célula. RhoB activo aumenta su tráfico intracelular hacia y desde la membrana plasmática. Al menos en el caso de Rac1, se ha descrito que la proteína se activa en endosomas positivos para Rab5 desde donde se dirige a la membrana plasmática. Nuestros resultados indican que RhoB está presente en dichos endosomas, por lo que podría interferir en la translocación de Rac1 hacia la membrana plasmática, internalizando a la proteína en vesículas que quedarían retenidas en el citosol a través de un mecanismo dependiente de actina filamentosa. En el caso de Akt, RhoB activo también induce su retención en endosomas (3).

3. Efecto diferencial de RhoB en la recuperación de la función de barrera en condiciones no inflamadas frente a inflamadas

RhoB aumenta su expresión en respuesta a TNF. Consecuentemente, el efecto del silenciamiento de RhoB en la recuperación de la función de barrera es significativamente menor en células no inflamadas: la comparación de la pendiente de la línea de resistencia transendotelial indica que la recuperación es más lenta en células estimuladas previamente con TNF (Fig. 16 y 30). Estos datos son consistentes con nuestros resultados sobre la interferencia de RhoB en la función de Rac y Akt. Puesto que en células no inflamadas el número de moléculas de RhoB es menor, Rac y Akt aumentan su presencia en la membrana plasmática desde donde pueden dirigir la polimerización de actina cortical y la formación del lamelipodio, acelerando la recuperación de la monocapa. De hecho, como se muestra en esta memoria, el inhibidor de Rac presenta un efecto más marcado en la recuperación de la monocapa tras la contracción protrombótica en células previamente tratadas con TNF que en células no inflamadas (Fig. 30B). Otros autores han reportado que TNF induce un retraso significativo de la reformación de la monocapa endotelial tras la contracción inducida por trombina. En este caso, este retraso ha sido atribuido a un aumento en la expresión del canal de iones Canal Receptor de Potencial Transitorio 1 (TRPC-1) inducido por TNF. TRPC-1 aumenta su expresión entre 1 y 6 horas tras la estimulación con TNF e incrementa la intensidad y duración en la elevación del calcio citosólico inducida por trombina (Paria et al. 2004). Este efecto sinérgico entre TNF y trombina mantiene las fuerzas contráctiles y amplifica el efecto de trombina sobre el endotelio. Previamente los autores habían descrito que la asociación de RhoA con el canal iónico es necesaria para la activación de TRPC-1 por trombina y el aumento de permeabilidad (Mehta et al. 2003). En base a nuestros resultados, sería interesante explorar si RhoB participa en la regulación de TRPC-1 y si el efecto diferencial de RhoB sobre la recuperación de la función de barrera entre células no inflamadas o inflamadas podría también explicarse a través de este mecanismo. El efecto diferencial de la inhibición de RhoB, Rac y probablemente también de Akt entre condiciones inflamadas y no inflamadas supone una oportunidad para controlar la integridad de la barrera endotelial en tejidos inflamados con un mínimo impacto sobre los sanos. Nuestros resultados en conjunción con los de los autores aquí mencionados construyen un escenario en el que la disrupción de la función de barrera como consecuencia de la acción de citoquinas proinflamatorias a largo plazo, como el TNF, no solo tiene como consecuencia el aumento de la permeabilidad, sino también una disminución de la integridad y la solidez de la monocapa endotelial. La reducción de la capacidad de las células endoteliales para recuperar la integridad de la monocapa hace al endotelio más sensible a la acción de agentes liberados en el contexto inflamatorio que inducen hiperpermeabilidad de la pared vascular. Aunque el estudio del papel de RhoB en la respuesta inflamatoria *in vivo* sería necesario, la observación de que la expresión de RhoB está incrementada en muestras de tejidos de pacientes con enfermedades inflamatorias crónicas sugiere que los resultados aquí expuestos podrían tener relevancia *in vivo*. Los reguladores negativos específicos de la recuperación de la función de barrera como RhoB podrían ser dianas terapéuticas útiles para preservar la integridad vascular en patologías inflamatorias.

CONCLUSIONES



1. La expresión de RhoB aumenta entre tres y cinco veces en respuesta a estímulos pro-inflamatorios en células endoteliales humanas.
2. La expresión de RhoB se encuentra incrementada en lesiones intestinales en tejidos humanos de pacientes con enfermedad de Crohn y en el endotelio sinusoidal.
3. RhoA, RhoB y RhoC se expresan y se activan de manera equitativa en células endoteliales tratadas con TNF.
4. RhoA, RhoB y RhoC presentan funciones redundantes o compensatorias en la regulación de la función de barrera y la polimerización de actina en células endoteliales no estimuladas con citoquinas inflamatorias.
5. RhoA, RhoB y RhoC presentan funciones redundantes en la polimerización de actina en células endoteliales estimuladas con TNF. RhoA, RhoB y RhoC no están implicadas en el aumento de la permeabilidad o de la trans migración leucocitaria en estas células *in vitro*.
6. RhoB regula específicamente la recuperación de la función de barrera tras la estimulación con trombina en células endoteliales inflamadas.
7. RhoB inhibe la expansión sobre el sustrato de la célula endotelial.
8. Durante la expansión sobre el sustrato el tráfico de RhoB entre el compartimento endosomal y la membrana plasmática se incrementa.
9. RhoB regula la actividad de Rac1 y Akt y las retienen en un compartimnto endosomal.
10. Rac1 y Akt son fundamentales para la recuperación de la monocapa endotelial tras la estimulación con trombina.
11. El efecto del silenciamiento de RhoB sobre la recuperación de la función de barrera endotelial depende de la actividad de Rac y de Akt.

En resumen, la GTPasa RhoB promueve la disfunción endotelial inducida por trombina al inhibir la expansión de la célula endotelial alterando el tráfico intracelular de Rac y Akt, ambas parte de la maquinaria que controla la polimerización de actina cortical y la formación del lamelipodio.

1. RhoB is upregulated between three and five fold by pro-inflammatory stimuli in human endothelial cells.
2. RhoB is highly expressed in intestine tissue samples from Crohn's disease patients and in the liver sinusoidal endothelium.
3. RhoA, RhoB and RhoC are similarly expressed and activated in TNF-stimulated endothelial cells.
4. RhoA, RhoB and RhoC play redundant or compensatory roles in the regulation of endothelial permeability and actin polymerization in non-inflamed endothelial cells.
5. RhoA, RhoB and RhoC play redundant roles in the regulation of actin polymerization in TNF-stimulated endothelial cells. RhoA, RhoB and RhoC do not regulate TNF-induced increase in endothelial permeability or leukocyte transmigration *in vitro*.
6. RhoB plays a predominant role in barrier function recovery after thrombin stimulation.
7. RhoB inhibits endothelial cell spreading.
8. During cell spreading, RhoB trafficking between endosomal compartment and plasma membrane is increased.
9. RhoB regulates Rac1 and Akt activity and retains both proteins in an endosomal compartment.
10. Rac1 and Akt activity and trafficking are essential for endothelial barrier recovery after thrombin stimulation.
11. RhoB silencing effect over endothelial barrier function recovery depends on Rac and Akt activity.

To sum up, RhoB favours thrombin-induced endothelial dysfunction through the inhibition of endothelial cell spreading. It regulates Rac1 and Akt localization and activity. Both of these proteins are part of the machinery that mediates cortical actin polymerization and lamellipodia formation.

BIBLIOGRAFÍA



- Abreu-Blanco, Maria Teresa, Jeffrey M. Verboon, y Susan M. Parkhurst. 2014. «Coordination of Rho Family GTPase Activities to Orchestrate Cytoskeleton Responses during Cell Wound Repair.» *Current Biology: CB* 24 (2): 144-55. doi:10.1016/j.cub.2013.11.048.
- Abu Taha, Abdallah, Muna Taha, Jochen Seebach, y Hans-J. Schnittler. 2014. «ARP2/3-Mediated Junction-Associated Lamellipodia Control VE-Cadherin-Based Cell Junction Dynamics and Maintain Monolayer Integrity.» *Molecular Biology of the Cell* 25 (2): 245-56. doi:10.1091/mbc.E13-07-0404.
- Ackah, Eric, Jun Yu, Stefan Zoellner, Yasuko Iwakiri, Carsten Skurk, Rei Shibata, Noriyuki Ouchi, et al. 2005. «Akt1/protein Kinase Balpha Is Critical for Ischemic and VEGF-Mediated Angiogenesis.» *The Journal of Clinical Investigation* 115 (8): 2119-27. doi:10.1172/JCI24726.
- Adams, David H., Cynthia Ju, Shashi K. Ramaiah, Jack Uetrecht, y Hartmut Jaeschke. 2010. «Mechanisms of Immune-Mediated Liver Injury.» *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 115 (2): 307-21. doi:10.1093/toxsci/kfq009.
- Adamson, P., S. Etienne, P. O. Couraud, V. Calder, y J. Greenwood. 1999. «Lymphocyte Migration through Brain Endothelial Cell Monolayers Involves Signaling through Endothelial ICAM-1 via a Rho-Dependent Pathway.» *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 162 (5): 2964-73.
- Adamson, P., C. J. Marshall, A. Hall, y P. A. Tilbrook. 1992. «Post-Translational Modifications of p21rho Proteins.» *The Journal of Biological Chemistry* 267 (28): 20033-38.
- Adamson, P., H. F. Paterson, y A. Hall. 1992. «Intracellular Localization of the P21rho Proteins.» *The Journal of Cell Biology* 119 (3): 617-27.
- Adini, Irit, Isaac Rabinovitz, Jing Fang Sun, George C. Prendergast, y Laura E. Benjamin. 2003. «RhoB Controls Akt Trafficking and Stage-Specific Survival of Endothelial Cells during Vascular Development.» *Genes & Development* 17 (21): 2721-32. doi:10.1101/gad.1134603.
- Aepfelbacher, M., M. Essler, E. Huber, M. Sugai, y P. C. Weber. 1997. «Bacterial Toxins Block Endothelial Wound Repair. Evidence That Rho GTPases Control Cytoskeletal Rearrangements in Migrating Endothelial Cells.» *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 17 (9): 1623-29.
- Ahn, Jiwon, Jeong-Hae Choi, Misun Won, Chang-Mo Kang, Mi-Rang Gyun, Hee-Moon Park, Chun-Ho Kim, y Kyung-Sook Chung. 2011. «The Activation of p38 MAPK Primarily Contributes to UV-Induced RhoB Expression by Recruiting the c-Jun and p300 to the Distal CCAAT Box of the RhoB Promoter.» *Biochemical and Biophysical Research Communications* 409 (2): 211-16. doi:10.1016/j.bbrc.2011.04.121.
- Alfano, Daniela, Pia Ragno, M. Patrizia Stoppelli, y Anne J. Ridley. 2012. «RhoB Regulates uPAR Signalling.» *Journal of Cell Science* 125 (Pt 10): 2369-80. doi:10.1242/jcs.091579.
- Amano, M., M. Ito, K. Kimura, Y. Fukata, K. Chihara, T. Nakano, Y. Matsuura, y K. Kaibuchi. 1996. «Phosphorylation and Activation of Myosin by Rho-Associated Kinase (Rho-Kinase).» *The Journal of Biological Chemistry* 271 (34): 20246-49.
- Amano, Mutsuki, Masanori Nakayama, y Kozo Kaibuchi. 2010. «Rho-kinase/ROCK: A Key Regulator of the Cytoskeleton and Cell Polarity.» *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)* 67 (9): 545-54. doi:10.1002/cm.20472.
- Angus, Derek C., y Tom van der Poll. 2013. «Severe Sepsis and Septic Shock.» *The New England Journal of Medicine* 369 (9): 840-51. doi:10.1056/NEJMr1208623.
- Anitei, Mihaela, Christoph Stange, Irina Parshina, Thorsten Baust, Annette Schenck, Graça Raposo, Tomas Kirchhausen, y Bernard Hoflack. 2010. «Protein Complexes Containing CYFIP/Sra/PIR121 Coordinate Arf1 and Rac1 Signalling during Clathrin-AP-1-Coated Carrier Biogenesis at the TGN.» *Nature Cell Biology* 12 (4): 330-40. doi:10.1038/ncb2034.

- Arnout, J., M. F. Hoylaerts, y H. R. Lijnen. 2006. «Haemostasis.» *Handbook of Experimental Pharmacology*, n.º 176 Pt 2: 1-41.
- Arthur, William T., Shawn M. Ellerbroek, Channing J. Der, Keith Burrige, y Krister Wennerberg. 2002. «XPLN, a Guanine Nucleotide Exchange Factor for RhoA and RhoB, but Not RhoC.» *The Journal of Biological Chemistry* 277 (45): 42964-72. doi:10.1074/jbc.M207401200.
- Aslam, Muhammad, Christian Tanislav, Christian Troidl, Rainer Schulz, Christian Hamm, y Dursun Gündüz. 2014. «cAMP Controls the Restoration of Endothelial Barrier Function after Thrombin-Induced Hyperpermeability via Rac1 Activation.» *Physiological Reports* 2 (10). doi:10.14814/phy2.12175.
- Aspenström, Pontus, Asa Fransson, y Jan Saras. 2004. «Rho GTPases Have Diverse Effects on the Organization of the Actin Filament System.» *The Biochemical Journal* 377 (Pt 2): 327-37. doi:10.1042/BJ20031041.
- Balkwill, Frances. 2006. «TNF-Alpha in Promotion and Progression of Cancer.» *Cancer Metastasis Reviews* 25 (3): 409-16. doi:10.1007/s10555-006-9005-3.
- Ball, Graeme, Richard M. Parton, Russell S. Hamilton, y Ilan Davis. 2012. «A Cell Biologist's Guide to High Resolution Imaging.» *Methods in Enzymology* 504: 29-55. doi:10.1016/B978-0-12-391857-4.00002-1.
- Bandman, Olga, Roger T. Coleman, Jeanne F. Loring, Jeffrey J. Seilhamer, y Benjamin G. Cocks. 2002. «Complexity of Inflammatory Responses in Endothelial Cells and Vascular Smooth Muscle Cells Determined by Microarray Analysis.» *Annals of the New York Academy of Sciences* 975 (diciembre): 77-90.
- Barnett, Stanley F., Deborah Defeo-Jones, Sheng Fu, Paula J. Hancock, Kathleen M. Haskell, Raymond E. Jones, Jason A. Kahana, et al. 2005. «Identification and Characterization of Pleckstrin-Homology-Domain-Dependent and Isoenzyme-Specific Akt Inhibitors.» *The Biochemical Journal* 385 (Pt 2): 399-408. doi:10.1042/BJ20041140.
- Bartelt, D. C., S. Moroney, y D. J. Wolff. 1987. «Purification, Characterization and Substrate Specificity of Calmodulin-Dependent Myosin Light-Chain Kinase from Bovine Brain.» *The Biochemical Journal* 247 (3): 747-56.
- Baumgart, Daniel C., y Simon R. Carding. 2007. «Inflammatory Bowel Disease: Cause and Immunobiology.» *Lancet* 369 (9573): 1627-40. doi:10.1016/S0140-6736(07)60750-8.
- Beckers, Cora M. L., Victor W. M. van Hinsbergh, y Geerten P. van Nieuw Amerongen. 2010. «Driving Rho GTPase Activity in Endothelial Cells Regulates Barrier Integrity.» *Thrombosis and Haemostasis* 103 (1): 40-55. doi:10.1160/TH09-06-0403.
- Berthold, Jessica, Kristina Schenkova, y Francisco Rivero. 2008. «Rho GTPases of the RhoBTB Subfamily and Tumorigenesis.» *Acta Pharmacologica Sinica* 29 (3): 285-95. doi:10.1111/j.1745-7254.2008.00773.x.
- Betzig, E., y R. J. Chichester. 1993. «Single Molecules Observed by near-Field Scanning Optical Microscopy.» *Science (New York, N.Y.)* 262 (5138): 1422-25. doi:10.1126/science.262.5138.1422.
- Bevilacqua, M. P., J. S. Pober, G. R. Majeau, W. Fiers, R. S. Cotran, y M. A. Gimbrone. 1986. «Recombinant Tumor Necrosis Factor Induces Procoagulant Activity in Cultured Human Vascular Endothelium: Characterization and Comparison with the Actions of Interleukin 1.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (12): 4533-37.
- Bhavsar, P. J., E. Infante, A. Khwaja, y A. J. Ridley. 2013. «Analysis of Rho GTPase Expression in T-ALL Identifies RhoU as a Target for Notch Involved in T-ALL Cell Migration.» *Oncogene* 32 (2): 198-208. doi:10.1038/onc.2012.42.
- Birukova, Anna A., Elena Alekseeva, Arsen Mikaelyan, y Konstantin G. Birukov. 2007. «HGF Attenuates Thrombin-Induced Endothelial Permeability by Tiam1-Mediated Activation of the Rac Pathway

- and by Tiam1/Rac-Dependent Inhibition of the Rho Pathway.» *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21 (11): 2776-86. doi:10.1096/fj.06-7660com.
- Birukova, Anna A., Ksenya Smurova, Konstantin G. Birukov, Kozo Kaibuchi, Joe G. N. Garcia, y Alexander D. Verin. 2004. «Role of Rho GTPases in Thrombin-Induced Lung Vascular Endothelial Cells Barrier Dysfunction.» *Microvascular Research* 67 (1): 64-77.
- Birukov, Konstantin G., Anna A. Birukova, Steven M. Dudek, Alexander D. Verin, Michael T. Crow, Xi Zhan, Natacha DePaola, y Joe G. N. Garcia. 2002. «Shear Stress-Mediated Cytoskeletal Remodeling and Cortactin Translocation in Pulmonary Endothelial Cells.» *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 26 (4): 453-64. doi:10.1165/ajrcmb.26.4.4725.
- Birukov, Konstantin G., Valery N. Bochkov, Anna A. Birukova, Kamon Kawkitinarong, Alexander Rios, Alexander Leitner, Alexander D. Verin, Gary M. Bokoch, Norbert Leitinger, y Joe G. N. Garcia. 2004. «Epoxycyclopentenone-Containing Oxidized Phospholipids Restore Endothelial Barrier Function via Cdc42 and Rac.» *Circulation Research* 95 (9): 892-901. doi:10.1161/01.RES.0000147310.18962.06.
- Black, R. A., C. T. Rauch, C. J. Kozlosky, J. J. Peschon, J. L. Slack, M. F. Wolfson, B. J. Castner, et al. 1997. «A Metalloproteinase Disintegrin That Releases Tumour-Necrosis Factor-Alpha from Cells.» *Nature* 385 (6618): 729-33. doi:10.1038/385729a0.
- Bokoch, G. M. 1994. «Regulation of the Human Neutrophil NADPH Oxidase by the Rac GTP-Binding Proteins.» *Current Opinion in Cell Biology* 6 (2): 212-18.
- Bombeli, T., A. Karsan, J. F. Tait, y J. M. Harlan. 1997. «Apoptotic Vascular Endothelial Cells Become Procoagulant.» *Blood* 89 (7): 2429-42.
- Borisoff, Julian Ilcheff, Henri M. H. Spronk, Sylvia Heeneman, y Hugo ten Cate. 2009. «Is Thrombin a Key Player in the “Coagulation-Atherogenesis” Maze?» *Cardiovascular Research* 82 (3): 392-403. doi:10.1093/cvr/cvp066.
- Boureux, Anthony, Emmanuel Vignal, Sandrine Faure, y Philippe Fort. 2007. «Evolution of the Rho Family of Ras-like GTPases in Eukaryotes.» *Molecular Biology and Evolution* 24 (1): 203-16. doi:10.1093/molbev/msl145.
- Bourne, H. R., D. A. Sanders, y F. McCormick. 1991. «The GTPase Superfamily: Conserved Structure and Molecular Mechanism.» *Nature* 349 (6305): 117-27. doi:10.1038/349117a0.
- Bousquet, Emilie, Julien Mazières, Maud Privat, Virginie Rizzati, Anne Casanova, Adeline Ledoux, Eliane Mery, Bettina Couderc, Gilles Favre, y Anne Pradines. 2009. «Loss of RhoB Expression Promotes Migration and Invasion of Human Bronchial Cells via Activation of AKT1.» *Cancer Research* 69 (15): 6092-99. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4147.
- Bradley, J. R. 2008. «TNF-Mediated Inflammatory Disease.» *The Journal of Pathology* 214 (2): 149-60. doi:10.1002/path.2287.
- Braga, V. M., L. M. Machesky, A. Hall, y N. A. Hotchin. 1997. «The Small GTPases Rho and Rac Are Required for the Establishment of Cadherin-Dependent Cell-Cell Contacts.» *The Journal of Cell Biology* 137 (6): 1421-31.
- Brenner, D. A., M. O'Hara, P. Angel, M. Chojkier, y M. Karin. 1989. «Prolonged Activation of Jun and Collagenase Genes by Tumour Necrosis Factor-Alpha.» *Nature* 337 (6208): 661-63. doi:10.1038/337661a0.
- Breslin, Jerome W., Xun E. Zhang, Rebecca A. Worthylake, y Flavia M. Souza-Smith. 2015. «Involvement of Local Lamellipodia in Endothelial Barrier Function.» *PloS One* 10 (2): e0117970. doi:10.1371/journal.pone.0117970.
- Burridge, Keith, y Krister Wennerberg. 2004. «Rho and Rac Take Center Stage.» *Cell* 116 (2): 167-79.

- Busse, R., y I. Fleming. 2006. «Vascular Endothelium and Blood Flow.» *Handbook of Experimental Pharmacology*, n.º 176 Pt 2: 43-78.
- Bustelo, X. R. 2002. «Knocked out by Rho/Rac T-Cell Biology.» *Histology and Histopathology* 17 (3): 871-75.
- Bustos, Rodrigo I., Marie-Annick Forget, Jeffrey E. Settleman, y Steen H. Hansen. 2008. «Coordination of Rho and Rac GTPase Function via p190B RhoGAP.» *Current Biology: CB* 18 (20): 1606-11. doi:10.1016/j.cub.2008.09.019.
- Cabal-Hierro, Lucía, y Pedro S Lazo. 2012. «Signal Transduction by Tumor Necrosis Factor Receptors.» *Cellular Signalling* 24 (6): 1297-1305. doi:10.1016/j.cellsig.2012.02.006.
- Cain, Robert J., Bart Vanhaesebroeck, y Anne J. Ridley. 2010. «The PI3K p110alpha Isoform Regulates Endothelial Adherens Junctions via Pyk2 and Rac1.» *The Journal of Cell Biology* 188 (6): 863-76. doi:10.1083/jcb.200907135.
- Campos, Silvia B., Sharon L. Ashworth, Sarah Wean, Melanie Hosford, Ruben M. Sandoval, Mark A. Hallett, Simon J. Atkinson, y Bruce A. Molitoris. 2009. «Cytokine-Induced F-Actin Reorganization in Endothelial Cells Involves RhoA Activation.» *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 296 (3): F487-95. doi:10.1152/ajprenal.00112.2008.
- Carbajal, J. M., y R. C. Schaeffer. 1999. «RhoA Inactivation Enhances Endothelial Barrier Function.» *The American Journal of Physiology* 277 (5 Pt 1): C955-64.
- Casteel, Darren E., Stephanie Turner, Raphaela Schwappacher, Hema Rangaswami, Jacqueline Su-Yuo, Shunhui Zhuang, Gerry R. Boss, y Renate B. Pilz. 2012. «Rho Isoform-Specific Interaction with IQGAP1 Promotes Breast Cancer Cell Proliferation and Migration.» *The Journal of Biological Chemistry* 287 (45): 38367-78. doi:10.1074/jbc.M112.377499.
- Cernuda-Morollón, Eva, y Anne J. Ridley. 2006. «Rho GTPases and Leukocyte Adhesion Receptor Expression and Function in Endothelial Cells.» *Circulation Research* 98 (6): 757-67. doi:10.1161/01.RES.0000210579.35304.d3.
- Chadda, Rahul, Mark T. Howes, Sarah J. Plowman, John F. Hancock, Robert G. Parton, y Satyajit Mayor. 2007. «Cholesterol-Sensitive Cdc42 Activation Regulates Actin Polymerization for Endocytosis via the GEEC Pathway.» *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 8 (6): 702-17. doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00565.x.
- Chang, Faith K., Noriko Sato, Noriko Kobayashi-Simorowski, Takashi Yoshihara, Jennifer L. Meth, y Masaaki Hamaguchi. 2006. «DBC2 Is Essential for Transporting Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein.» *Journal of Molecular Biology* 364 (3): 302-8. doi:10.1016/j.jmb.2006.09.026.
- Chavakis, E., E. Dernbach, C. Hermann, U. F. Mondorf, A. M. Zeiher, y S. Dimmeler. 2001. «Oxidized LDL Inhibits Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Endothelial Cell Migration by an Inhibitory Effect on the Akt/endothelial Nitric Oxide Synthase Pathway.» *Circulation* 103 (16): 2102-7.
- Chen, Juhua, Payaningal R. Somanath, Olga Razorenova, William S. Chen, Nissim Hay, Paul Bornstein, y Tatiana V. Byzova. 2005. «Akt1 Regulates Pathological Angiogenesis, Vascular Maturation and Permeability in Vivo.» *Nature Medicine* 11 (11): 1188-96. doi:10.1038/nm1307.
- Chen, Z., J. Sun, A. Pradines, G. Favre, J. Adnane, y S. M. Sebt. 2000. «Both Farnesylated and Geranylgeranylated RhoB Inhibit Malignant Transformation and Suppress Human Tumor Growth in Nude Mice.» *The Journal of Biological Chemistry* 275 (24): 17974-78. doi:10.1074/jbc.C000145200.
- Cherfils, Jacqueline, y Mahel Zeghouf. 2013. «Regulation of Small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs.» *Physiological Reviews* 93 (1): 269-309. doi:10.1152/physrev.00003.2012.
- Chircop, Megan. 2014. «Rho GTPases as Regulators of Mitosis and Cytokinesis in Mammalian Cells.» *Small GTPases* 5. doi:10.4161/sgtp.29770.

- Chrzanowska-Wodnicka, M., y K. Burridge. 1996. «Rho-Stimulated Contractility Drives the Formation of Stress Fibers and Focal Adhesions.» *The Journal of Cell Biology* 133 (6): 1403-15.
- Citi, Sandra, Diego Guerrero, Domenica Spadaro, y Jimit Shah. 2014. «Epithelial Junctions and Rho Family GTPases: The Zonular Signalosome.» *Small GTPases* 5 (4): 1-15. doi:10.4161/21541248.2014.973760.
- Clark, E. A., T. R. Golub, E. S. Lander, y R. O. Hynes. 2000. «Genomic Analysis of Metastasis Reveals an Essential Role for RhoC.» *Nature* 406 (6795): 532-35. doi:10.1038/35020106.
- Cohnheim, J. 1889. «Lectures on General pathology: A Handbook for Practitioners and Students». London: *The New Sideham Society*.
- Compston, Alastair, y Alasdair Coles. 2008. «Multiple Sclerosis.» *Lancet* 372 (9648): 1502-17. doi:10.1016/S0140-6736(08)61620-7.
- Coughlin, S. R. 1999. «How the Protease Thrombin Talks to Cells.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (20): 11023-27.
- Coughlin, S. R. 2000. «Thrombin Signalling and Protease-Activated Receptors.» *Nature* 407 (6801): 258-64. doi:10.1038/35025229.
- Croce, Kevin, y Peter Libby. 2007. «Intertwining of Thrombosis and Inflammation in Atherosclerosis.» *Current Opinion in Hematology* 14 (1): 55-61.
- Croft, Daniel R., y Michael F. Olson. 2011. «Transcriptional Regulation of Rho GTPase Signaling.» *Transcription* 2 (5): 211-15. doi:10.4161/trns.2.5.16904.
- Dachsel, Justus C., Siu P. Ngok, Laura J. Lewis-Tuffin, Antonis Kourtidis, Rory Geyer, Lauren Johnston, Ryan Feathers, y Panos Z. Anastasiadis. 2013. «The Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor Syx Regulates the Balance of Dia and ROCK Activities to Promote Polarized-Cancer-Cell Migration.» *Molecular and Cellular Biology* 33 (24): 4909-18. doi:10.1128/MCB.00565-13.
- De Camilli, P., S. D. Emr, P. S. McPherson, y P. Novick. 1996. «Phosphoinositides as Regulators in Membrane Traffic.» *Science (New York, N.Y.)* 271 (5255): 1533-39.
- de Cremoux, P., C. Gauville, V. Closson, G. Linares, F. Calvo, A. Tavitian, y B. Olofsson. 1994. «EGF Modulation of the Ras-Related rhoB Gene Expression in Human Breast-Cancer Cell Lines.» *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 59 (3): 408-15.
- Dejana, Elisabetta. 2004. «Endothelial Cell-Cell Junctions: Happy Together.» *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 5 (4): 261-70. doi:10.1038/nrm1357.
- Deli, M. A., L. Descamps, M. P. Dehouck, R. Cecchelli, F. Joó, C. S. Abrahám, y G. Torpier. 1995. «Exposure of Tumor Necrosis Factor-Alpha to Luminal Membrane of Bovine Brain Capillary Endothelial Cells Cocultured with Astrocytes Induces a Delayed Increase of Permeability and Cytoplasmic Stress Fiber Formation of Actin.» *Journal of Neuroscience Research* 41 (6): 717-26. doi:10.1002/jnr.490410602.
- Dickson, R. M., D. J. Norris, Y. L. Tzeng, y W. E. Moerner. 1996. «Three-Dimensional Imaging of Single Molecules Solvated in Pores of Poly(acrylamide) Gels.» *Science (New York, N.Y.)* 274 (5289): 966-69.
- Didsbury, J., R. F. Weber, G. M. Bokoch, T. Evans, y R. Snyderman. 1989. «Rac, a Novel Ras-Related Family of Proteins That Are Botulinum Toxin Substrates.» *The Journal of Biological Chemistry* 264 (28): 16378-82.
- Di Lorenzo, Annarita, Carlos Fernández-Hernando, Giuseppe Cirino, y William C. Sessa. 2009. «Akt1 Is Critical for Acute Inflammation and Histamine-Mediated Vascular Leakage.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (34): 14552-57. doi:10.1073/pnas.0904073106.

- Di Paolo, Gilbert, y Pietro De Camilli. 2006. «Phosphoinositides in Cell Regulation and Membrane Dynamics.» *Nature* 443 (7112): 651-57. doi:10.1038/nature05185.
- Djouder, N., G. Schmidt, M. Frings, A. Cavalié, M. Thelen, y K. Aktories. 2001. «Rac and Phosphatidylinositol 3-Kinase Regulate the Protein Kinase B in Fc Epsilon RI Signaling in RBL 2H3 Mast Cells.» *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 166 (3): 1627-34.
- Donaldson, Julie G., Natalie Porat-Shliom, y Lee Ann Cohen. 2009. «Clathrin-Independent Endocytosis: A Unique Platform for Cell Signaling and PM Remodeling.» *Cellular Signalling* 21 (1): 1-6. doi:10.1016/j.cellsig.2008.06.020.
- Edeling, Melissa A., Corinne Smith, y David Owen. 2006. «Life of a Clathrin Coat: Insights from Clathrin and AP Structures.» *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 7 (1): 32-44. doi:10.1038/nrm1786.
- Engel, M. E., P. K. Datta, y H. L. Moses. 1998. «RhoB Is Stabilized by Transforming Growth Factor Beta and Antagonizes Transcriptional Activation.» *The Journal of Biological Chemistry* 273 (16): 9921-26.
- Enomoto, Atsushi, Hideki Murakami, Naoya Asai, Nobuhiro Morone, Takashi Watanabe, Kumi Kawai, Yoshiki Murakumo, Jiro Usukura, Kozo Kaibuchi, y Masahide Takahashi. 2005. «Akt/PKB Regulates Actin Organization and Cell Motility via Girdin/APE.» *Developmental Cell* 9 (3): 389-402. doi:10.1016/j.devcel.2005.08.001.
- Erickson, J. W., C. j Zhang, R. A. Kahn, T. Evans, y R. A. Cerione. 1996. «Mammalian Cdc42 Is a Brefeldin A-Sensitive Component of the Golgi Apparatus.» *The Journal of Biological Chemistry* 271 (43): 26850-54.
- Etienne-Manneville, Sandrine, y Alan Hall. 2002. «Rho GTPases in Cell Biology.» *Nature* 420 (6916): 629-35. doi:10.1038/nature01148.
- Etienne, S., P. Adamson, J. Greenwood, A. D. Strosberg, S. Cazaubon, y P. O. Couraud. 1998. «ICAM-1 Signaling Pathways Associated with Rho Activation in Microvascular Brain Endothelial Cells.» *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 161 (10): 5755-61.
- Faucherre, Adèle, Pierrette Desbois, Véronique Satre, Joël Lunardi, Olivier Dorseuil, y Gérard Gacon. 2003. «Lowe Syndrome Protein OCRL1 Interacts with Rac GTPase in the Trans-Golgi Network.» *Human Molecular Genetics* 12 (19): 2449-56. doi:10.1093/hmg/ddg250.
- Fernandez-Borja, Mar, Lennert Janssen, Desiree Verwoerd, Peter Hordijk, y Jacques Neefjes. 2005. «RhoB Regulates Endosome Transport by Promoting Actin Assembly on Endosomal Membranes through Dia1.» *Journal of Cell Science* 118 (Pt 12): 2661-70. doi:10.1242/jcs.02384.
- Fernández-Martín, Laura, Beatriz Marcos-Ramiro, Carolina L Bigarella, Mariona Graupera, Robert J Cain, Natalia Reglero-Real, Anaïs Jiménez, et al. 2012. «Crosstalk between Reticular Adherens Junctions and Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 Regulates Endothelial Barrier Function.» *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 32 (8): e90-102. doi:10.1161/ATVBAHA.112.252080.
- Finigan, James H., Steven M. Dudek, Patrick A. Singleton, Eddie T. Chiang, Jeffrey R. Jacobson, Sara M. Camp, Shiu Q. Ye, y Joe G. N. Garcia. 2005. «Activated Protein C Mediates Novel Lung Endothelial Barrier Enhancement: Role of Sphingosine 1-Phosphate Receptor Transactivation.» *The Journal of Biological Chemistry* 280 (17): 17286-93. doi:10.1074/jbc.M412427200.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, y C. C. Mello. 1998. «Potent and Specific Genetic Interference by Double-Stranded RNA in *Caenorhabditis Elegans*.» *Nature* 391 (6669): 806-11. doi:10.1038/35888.
- Fleming, I., J. Bauersachs, y R. Busse. 1996. «Paracrine Functions of the Coronary Vascular Endothelium.» *Molecular and Cellular Biochemistry* 157 (1-2): 137-45.
- Flynn, P., H. Mellor, A. Casamassima, y P. J. Parker. 2000. «Rho GTPase Control of Protein Kinase C-Related

- Protein Kinase Activation by 3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase.» *The Journal of Biological Chemistry* 275 (15): 11064-70.
- Fragoso, José Manuel, Gilberto Vargas Alarcón, Silvia Jiménez Morales, Octavio Daniel Reyes Hernández, y Julián Ramírez Bello. 2014. «[Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in autoimmune diseases (AIDs): molecular biology and genetics].» *Gaceta Médica De México* 150 (4): 334-44.
- Frey, Randall S., Masuko Ushio-Fukai, y Asrar B. Malik. 2009. «NADPH Oxidase-Dependent Signaling in Endothelial Cells: Role in Physiology and Pathophysiology.» *Antioxidants & Redox Signaling* 11 (4): 791-810. doi:10.1089/ARS.2008.2220.
- Fritsch, Ralph, Inge de Krijger, Kornelia Fritsch, Roger George, Beth Reason, Madhu S. Kumar, Markus Diefenbacher, Gordon Stamp, y Julian Downward. 2013. «RAS and RHO Families of GTPases Directly Regulate Distinct Phosphoinositide 3-Kinase Isoforms.» *Cell* 153 (5): 1050-63. doi:10.1016/j.cell.2013.04.031.
- Fritz, G., R. Gnad, y B. Kaina. 1999. «Cell and Tissue-Type Specific Expression of Ras-Related GTPase RhoB.» *Anticancer Research* 19 (3A): 1681-88.
- Fritz, G., y B. Kaina. 1997. «rhoB Encoding a UV-Inducible Ras-Related Small GTP-Binding Protein Is Regulated by GTPases of the Rho Family and Independent of JNK, ERK, and p38 MAP Kinase.» *The Journal of Biological Chemistry* 272 (49): 30637-44.
- Gampel, A., P. J. Parker, y H. Mellor. 1999. «Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor Traffic by the Small GTPase rhoB.» *Current Biology: CB* 9 (17): 955-58.
- Gao, Yuan, J. Bradley Dickerson, Fukun Guo, Jie Zheng, y Yi Zheng. 2004. «Rational Design and Characterization of a Rac GTPase-Specific Small Molecule Inhibitor.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (20): 7618-23. doi:10.1073/pnas.0307512101.
- Garcia, J. G., A. Siflinger-Birnboim, R. Bizios, P. J. Del Vecchio, J. W. Fenton, y A. B. Malik. 1986. «Thrombin-Induced Increase in Albumin Permeability across the Endothelium.» *Journal of Cellular Physiology* 128 (1): 96-104. doi:10.1002/jcp.1041280115.
- Garcia, J. G., A. D. Verin, y K. L. Schaphorst. 1996. «Regulation of Thrombin-Mediated Endothelial Cell Contraction and Permeability.» *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 22 (4): 309-15. doi:10.1055/s-2007-999025.
- Genot, E. M., C. Arriuerlou, G. Ku, B. M. Burgering, A. Weiss, y I. M. Kramer. 2000. «The T-Cell Receptor Regulates Akt (protein Kinase B) via a Pathway Involving Rac1 and Phosphatidylinositide 3-Kinase.» *Molecular and Cellular Biology* 20 (15): 5469-78.
- Gerald, Damien, Irit Adini, Sharon Shechter, Carole Perruzzi, Joseph Varnau, Benjamin Hopkins, Shiva Kazerounian, et al. 2013. «RhoB Controls Coordination of Adult Angiogenesis and Lymphangiogenesis Following Injury by Regulating VEZF1-Mediated Transcription.» *Nature Communications* 4: 2824. doi:10.1038/ncomms3824.
- Gertzberg, Nancy, Paul Neumann, Victor Rizzo, y Arnold Johnson. 2004. «NAD(P)H Oxidase Mediates the Endothelial Barrier Dysfunction Induced by TNF-Alpha.» *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 286 (1): L37-48. doi:10.1152/ajplung.00116.2003.
- Grivennikov, Sergei I., Florian R. Greten, y Michael Karin. 2010. «Immunity, Inflammation, and Cancer.» *Cell* 140 (6): 883-99. doi:10.1016/j.cell.2010.01.025.
- Hakem, Anne, Otto Sanchez-Sweatman, Annick You-Ten, Gordon Duncan, Andrew Wakeham, Rama Khokha, y Tak W. Mak. 2005. «RhoC Is Dispensable for Embryogenesis and Tumor Initiation but Essential for Metastasis.» *Genes & Development* 19 (17): 1974-79. doi:10.1101/gad.1310805.
- Hall, A. 1998. «Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton.» *Science (New York, N.Y.)* 279 (5350): 509-14.

- Hamel, Brant, Elizabeth Monaghan-Benson, Rafael J. Rojas, Brenda R. S. Temple, Daniel J. Marston, Keith Burridge, y John Sondek. 2011. «SmgGDS Is a Guanine Nucleotide Exchange Factor That Specifically Activates RhoA and RhoC.» *The Journal of Biological Chemistry* 286 (14): 12141-48. doi:10.1074/jbc.M110.191122.
- Han, May H., Sun-Il Hwang, Dolly B. Roy, Deborah H. Lundgren, Jordan V. Price, Shalina S. Ousman, Guy Haskin Fernald, et al. 2008. «Proteomic Analysis of Active Multiple Sclerosis Lesions Reveals Therapeutic Targets.» *Nature* 451 (7182): 1076-81. doi:10.1038/nature06559.
- Heasman, Sarah J., y Anne J. Ridley. 2008. «Mammalian Rho GTPases: New Insights into Their Functions from in Vivo Studies.» *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9 (9): 690-701. doi:10.1038/nrm2476.
- Hell, S. W., y J. Wichmann. 1994. «Breaking the Diffraction Resolution Limit by Stimulated Emission: Stimulated-Emission-Depletion Fluorescence Microscopy.» *Optics Letters* 19 (11): 780-82.
- Hemmings, B. A. 1997. «Akt Signaling: Linking Membrane Events to Life and Death Decisions.» *Science (New York, N.Y.)* 275 (5300): 628-30.
- Henriques, Ricardo, Mickael Lelek, Eugenio F. Fornasiero, Flavia Valtorta, Christophe Zimmer, y Musa M. Mhlana. 2010. «QuickPALM: 3D Real-Time Photoactivation Nanoscopy Image Processing in ImageJ.» *Nature Methods* 7 (5): 339-40. doi:10.1038/nmeth0510-339.
- Higuchi, M., N. Masuyama, Y. Fukui, A. Suzuki, y Y. Gotoh. 2001. «Akt Mediates Rac/Cdc42-Regulated Cell Motility in Growth Factor-Stimulated Cells and in Invasive PTEN Knockout Cells.» *Current Biology: CB* 11 (24): 1958-62.
- Hori, Y., A. Kikuchi, M. Isomura, M. Katayama, Y. Miura, H. Fujioka, K. Kaibuchi, y Y. Takai. 1991. «Post-Translational Modifications of the C-Terminal Region of the Rho Protein Are Important for Its Interaction with Membranes and the Stimulatory and Inhibitory GDP/GTP Exchange Proteins.» *Oncogene* 6 (4): 515-22.
- Ho, T. T. Giang, Sofia D. Merajver, Charles M. Lapière, Betty V. Nusgens, y Christophe F. Deroanne. 2008. «RhoA-GDP Regulates RhoB Protein Stability. Potential Involvement of RhoGDIalpha.» *The Journal of Biological Chemistry* 283 (31): 21588-98. doi:10.1074/jbc.M710033200.
- Huang, Minzhou, James B. Duhadaway, George C. Prendergast, y Lisa D. Laury-Kleintop. 2007. «RhoB Regulates PDGFR-Beta Trafficking and Signaling in Vascular Smooth Muscle Cells.» *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27 (12): 2597-2605. doi:10.1161/ATVBAHA.107.154211.
- Huang, Minzhou, Lauren Satchell, James B. Duhadaway, George C. Prendergast, y Lisa D. Laury-Kleintop. 2011. «RhoB Links PDGF Signaling to Cell Migration by Coordinating Activation and Localization of Cdc42 and Rac.» *Journal of Cellular Biochemistry* 112 (6): 1572-84. doi:10.1002/jcb.23069.
- Huang, M., y G. C. Prendergast. 2006. «RhoB in Cancer Suppression.» *Histology and Histopathology* 21 (2): 213-18.
- Hung, D. T., Y. H. Wong, T. K. Vu, y S. R. Coughlin. 1992. «The Cloned Platelet Thrombin Receptor Couples to at Least Two Distinct Effectors to Stimulate Phosphoinositide Hydrolysis and Inhibit Adenylyl Cyclase.» *The Journal of Biological Chemistry* 267 (29): 20831-34.
- Hutchinson, Catherine L., Peter N. Lowe, Stephen H. McLaughlin, Helen R. Mott, y Darerca Owen. 2013. «Differential Binding of RhoA, RhoB, and RhoC to Protein Kinase C-Related Kinase (PRK) Isoforms PRK1, PRK2, and PRK3: PRKs Have the Highest Affinity for RhoB.» *Biochemistry* 52 (45): 7999-8011. doi:10.1021/bi401216w.
- Ishizaki, T., M. Maekawa, K. Fujisawa, K. Okawa, A. Iwamatsu, A. Fujita, N. Watanabe, et al. 1996. «The Small GTP-Binding Protein Rho Binds to and Activates a 160 kDa Ser/Thr Protein Kinase Homologous to Myotonic Dystrophy Kinase.» *The EMBO Journal* 15 (8): 1885-93.

- Jacobson, Jeffrey R., Steven M. Dudek, Patrick A. Singleton, Irina A. Kolosova, Alexander D. Verin, y Joe G. N. Garcia. 2006. «Endothelial Cell Barrier Enhancement by ATP Is Mediated by the Small GTPase Rac and Cortactin.» *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 291 (2): L289-95. doi:10.1152/ajplung.00343.2005.
- Jacobson, J. R., y J. G. N. Garcia. 2007. «Novel Therapies for Microvascular Permeability in Sepsis.» *Current Drug Targets* 8 (4): 509-14.
- Jaiswal, Mamta, Lothar Gremer, Radovan Dvorsky, Lars Christian Haeusler, Ion C. Cirstea, Katharina Uhlenbrock, y Mohammad Reza Ahmadian. 2011. «Mechanistic Insights into Specificity, Activity, and Regulatory Elements of the Regulator of G-Protein Signaling (RGS)-Containing Rho-Specific Guanine Nucleotide Exchange Factors (GEFs) p115, PDZ-RhoGEF (PRG), and Leukemia-Associated RhoGEF (LARG).» *The Journal of Biological Chemistry* 286 (20): 18202-12. doi:10.1074/jbc.M111.226431.
- Jarcho, S. 1970. «Caubius on inflammation». *I. Am. J. Cardiol.* 26:192-195.
- Jiang, Kun, Bin Zhong, Connie Ritchey, Danielle L. Gilvary, Elizabeth Hong-Geller, Sheng Wei, y Julie Y. Djeu. 2003. «Regulation of Akt-Dependent Cell Survival by Syk and Rac.» *Blood* 101 (1): 236-44. doi:10.1182/blood-2002-04-1251.
- Johari, Vandita, y Chandravathi Loke. 2012. «Brief Overview of the Coagulation Cascade.» *Disease-a-Month: DM* 58 (8): 421-23. doi:10.1016/j.disamonth.2012.04.004.
- Johnson, Heath E., Samantha J. King, Sreeja B. Asokan, Jeremy D. Rotty, James E. Bear, y Jason M. Haugh. 2015. «F-Actin Bundles Direct the Initiation and Orientation of Lamellipodia through Adhesion-Based Signaling.» *The Journal of Cell Biology*, febrero. doi:10.1083/jcb.201406102.
- Johnson, K., Y. Choi, E. DeGroot, I. Samuels, A. Creasey, y L. Aarden. 1998. «Potential Mechanisms for a Proinflammatory Vascular Cytokine Response to Coagulation Activation.» *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 160 (10): 5130-35.
- Kaibuchi, K., S. Kuroda, y M. Amano. 1999. «Regulation of the Cytoskeleton and Cell Adhesion by the Rho Family GTPases in Mammalian Cells.» *Annual Review of Biochemistry* 68: 459-86. doi:10.1146/annurev.biochem.68.1.459.
- Kant, Shashi, Wojciech Swat, Sheng Zhang, Zhong-Yin Zhang, Benjamin G. Neel, Richard A. Flavell, y Roger J. Davis. 2011. «TNF-Stimulated MAP Kinase Activation Mediated by a Rho Family GTPase Signaling Pathway.» *Genes & Development* 25 (19): 2069-78. doi:10.1101/gad.17224711.
- Karlsson, R., E. D. Pedersen, Z. Wang, y Cord Brakebusch. 2009. «Rho GTPase Function in Tumorigenesis.» *Biochimica Et Biophysica Acta* 1796 (2): 91-98. doi:10.1016/j.bbcan.2009.03.003.
- Katayama, M., M. Kawata, Y. Yoshida, H. Horiuchi, T. Yamamoto, Y. Matsuura, y Y. Takai. 1991. «The Posttranslationally Modified C-Terminal Structure of Bovine Aortic Smooth Muscle rhoA p21.» *The Journal of Biological Chemistry* 266 (19): 12639-45.
- Kazerounian, Shiva, Damien Gerald, Minzhou Huang, Y. Rebecca Chin, Durga Udayakumar, Ningning Zheng, Rebekah K. O'Donnell, et al. 2013. «RhoB Differentially Controls Akt Function in Tumor Cells and Stromal Endothelial Cells during Breast Tumorigenesis.» *Cancer Research* 73 (1): 50-61. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3055.
- Kimura, K., M. Ito, M. Amano, K. Chihara, Y. Fukata, M. Nakafuku, B. Yamamori, et al. 1996. «Regulation of Myosin Phosphatase by Rho and Rho-Associated Kinase (Rho-Kinase).» *Science (New York, N.Y.)* 273 (5272): 245-48.
- Kim, You-Sun, Michael J. Morgan, Swati Choksi, y Zheng-Gang Liu. 2007. «TNF-Induced Activation of the Nox1 NADPH Oxidase and Its Role in the Induction of Necrotic Cell Death.» *Molecular Cell* 26 (5): 675-87. doi:10.1016/j.molcel.2007.04.021.

- Kiskowski, Maria A., John F. Hancock, y Anne K. Kenworthy. 2009. «On the Use of Ripley's K-Function and Its Derivatives to Analyze Domain Size.» *Biophysical Journal* 97 (4): 1095-1103. doi:10.1016/j.bpj.2009.05.039.
- Klausner, R. D., J. G. Donaldson, y J. Lippincott-Schwartz. 1992. «Brefeldin A: Insights into the Control of Membrane Traffic and Organelle Structure.» *The Journal of Cell Biology* 116 (5): 1071-80.
- Knezevic, Nebojsa, Mohammad Tauseef, Tracy Thennes, y Dolly Mehta. 2009. «The G Protein Betagamma Subunit Mediates Reannealing of Adherens Junctions to Reverse Endothelial Permeability Increase by Thrombin.» *The Journal of Experimental Medicine* 206 (12): 2761-77. doi:10.1084/jem.20090652.
- Komarova, Yulia A., Dolly Mehta, y Asrar B. Malik. 2007. «Dual Regulation of Endothelial Junctional Permeability.» *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment* 2007 (412): re8. doi:10.1126/stke.4122007re8.
- Königs, Volker, Richard Jennings, Thomas Vogl, Markus Horsthemke, Anne C. Bachg, Yan Xu, Kay Grobe, et al. 2014. «Mouse Macrophages Completely Lacking Rho Subfamily GTPases (RhoA, RhoB, and RhoC) Have Severe Lamellipodial Retraction Defects, but Robust Chemotactic Navigation and Altered Motility.» *The Journal of Biological Chemistry* 289 (44): 30772-84. doi:10.1074/jbc.M114.563270.
- Konstantinidis, Diamantis G., Suvarnamala Pushkaran, James F. Johnson, Jose A. Cancelas, Stefanos Manganaris, Chad E. Harris, David A. Williams, Yi Zheng, y Theodosia A. Kalfa. 2012. «Signaling and Cytoskeletal Requirements in Erythroblast Enucleation.» *Blood* 119 (25): 6118-27. doi:10.1182/blood-2011-09-379263.
- Kozma, R., S. Ahmed, A. Best, y L. Lim. 1996. «The GTPase-Activating Protein N-Chimaerin Cooperates with Rac1 and Cdc42Hs to Induce the Formation of Lamellipodia and Filopodia.» *Molecular and Cellular Biology* 16 (9): 5069-80.
- Kroon, Jeffrey, Simon Tol, Sven van Amstel, Judith A. Elias, y Mar Fernandez-Borja. 2013. «The Small GTPase RhoB Regulates TNF α Signaling in Endothelial Cells.» *PLoS One* 8 (9): e75031. doi:10.1371/journal.pone.0075031.
- Kuroda, S., M. Fukata, K. Fujii, T. Nakamura, I. Izawa, y K. Kaibuchi. 1997. «Regulation of Cell-Cell Adhesion of MDCK Cells by Cdc42 and Rac1 Small GTPases.» *Biochemical and Biophysical Research Communications* 240 (2): 430-35. doi:10.1006/bbrc.1997.7675.
- Kurokawa, Kazuo, Reina E. Itoh, Hisayoshi Yoshizaki, Yusuke Ohba Takeshi Nakamura, y Michiyuki Matsuda. 2004. «Coactivation of Rac1 and Cdc42 at Lamellipodia and Membrane Ruffles Induced by Epidermal Growth Factor.» *Molecular Biology of the Cell* 15 (3): 1003-10. doi:10.1091/mbc.E03-08-0609.
- Kwon, T., D. Y. Kwon, J. Chun, J. H. Kim, y S. S. Kang. 2000. «Akt Protein Kinase Inhibits Rac1-GTP Binding through Phosphorylation at Serine 71 of Rac1.» *The Journal of Biological Chemistry* 275 (1): 423-28.
- Laemmli, U. K. 1970. «Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4.» *Nature* 227 (5259): 680-85.
- Lappalainen, P., y D. G. Drubin. 1997. «Cofilin Promotes Rapid Actin Filament Turnover in Vivo.» *Nature* 388 (6637): 78-82. doi:10.1038/40418.
- Lawson, Campbell D., y Keith Burridge. 2014. «The on-off Relationship of Rho and Rac during Integrin-Mediated Adhesion and Cell Migration.» *Small GTPases* 5: e27958. doi:10.4161/sgtp.27958.
- Le Clainche, Christophe, y Marie-France Carlier. 2008. «Regulation of Actin Assembly Associated with Protrusion and Adhesion in Cell Migration.» *Physiological Reviews* 88 (2): 489-513. doi:10.1152/physrev.00021.2007.

- Lee, M. J., S. Thangada, J. H. Paik, G. P. Sapkota, N. Ancellin, S. S. Chae, M. Wu, et al. 2001. «Akt-Mediated Phosphorylation of the G Protein-Coupled Receptor EDG-1 Is Required for Endothelial Cell Chemotaxis.» *Molecular Cell* 8 (3): 693-704.
- Levi, Marcel, Tom van der Poll, y Harry R. Büller. 2004. «Bidirectional Relation between Inflammation and Coagulation.» *Circulation* 109 (22): 2698-2704. doi:10.1161/01.CIR.0000131660.51520.9A.
- Levi, Marcel, Tom van der Poll, y Marcus Schultz. 2012. «Infection and Inflammation as Risk Factors for Thrombosis and Atherosclerosis.» *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 38 (5): 506-14. doi:10.1055/s-0032-1305782.
- Libby, Peter. 2002. «Inflammation in Atherosclerosis.» *Nature* 420 (6917): 868-74. doi:10.1038/nature01323.
- Libby, Peter. 2012. «History of Discovery: Inflammation in Atherosclerosis.» *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 32 (9): 2045-51. doi:10.1161/ATVBAHA.108.179705.
- Li, Jian-Mei, Lampson M Fan, Michael R Christie, y Ajay M Shah. 2005. «Acute Tumor Necrosis Factor Alpha Signaling via NADPH Oxidase in Microvascular Endothelial Cells: Role of p47phox Phosphorylation and Binding to TRAF4.» *Molecular and Cellular Biology* 25 (6): 2320-30. doi:10.1128/MCB.25.6.2320-2330.2005.
- Linder, Stefan, y Martin Aepfelbacher. 2003. «Podosomes: Adhesion Hot-Spots of Invasive Cells.» *Trends in Cell Biology* 13 (7): 376-85.
- Liu, A. X., N. Rane, J. P. Liu, y G. C. Prendergast. 2001. «RhoB Is Dispensable for Mouse Development, but It Modifies Susceptibility to Tumor Formation as Well as Cell Adhesion and Growth Factor Signaling in Transformed Cells.» *Molecular and Cellular Biology* 21 (20): 6906-12. doi:10.1128/MCB.21.20.6906-6912.2001.
- Liu, Feng, Kane L. Schaphorst, Alexander D. Verin, Keri Jacobs, Anna Birukova, Regina M. Day, Natalia Bogatcheva, D. P. Bottaro, y Joe G. N. Garcia. 2002. «Hepatocyte Growth Factor Enhances Endothelial Cell Barrier Function and Cortical Cytoskeletal Rearrangement: Potential Role of Glycogen Synthase Kinase-3beta.» *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16 (9): 950-62. doi:10.1096/fj.01-0870com.
- Li, Zhong, Xuemei Dong, Xuemei Dong, Zhenglong Wang, Wenzhong Liu, Ning Deng, Yu Ding, et al. 2005. «Regulation of PTEN by Rho Small GTPases.» *Nature Cell Biology* 7 (4): 399-404. doi:10.1038/ncb1236.
- Li, Z., H. Jiang, W. Xie, Z. Zhang, A. V. Smrcka, y D. Wu. 2000. «Roles of PLC-beta2 and -beta3 and PI3Kgamma in Chemoattractant-Mediated Signal Transduction.» *Science (New York, N.Y.)* 287 (5455): 1046-49.
- Luna, Ana, Olga B. Matas, José Angel Martínez-Menárguez, Eugenia Mato, Juan M. Durán, José Ballesta, Michael Way, y Gustavo Egea. 2002. «Regulation of Protein Transport from the Golgi Complex to the Endoplasmic Reticulum by CDC42 and N-WASP.» *Molecular Biology of the Cell* 13 (3): 866-79. doi:10.1091/mbc.01-12-0579.
- Macia, Eric, Marcelo Ehrlich, Ramiro Massol, Emmanuel Boucrot, Christian Brunner, y Tomas Kirchhausen. 2006. «Dynasore, a Cell-Permeable Inhibitor of Dynamin.» *Developmental Cell* 10 (6): 839-50. doi:10.1016/j.devcel.2006.04.002.
- Madaule, P., y R. Axel. 1985. «A Novel Ras-Related Gene Family.» *Cell* 41 (1): 31-40.
- Madge, L. A., y J. S. Pober. 2001. «TNF Signaling in Vascular Endothelial Cells.» *Experimental and Molecular Pathology* 70 (3): 317-25. doi:10.1006/exmp.2001.2368.
- Maekawa, M., T. Ishizaki, S. Boku, N. Watanabe, A. Fujita, A. Iwamatsu, T. Obinata, K. Ohashi, K. Mizuno, y S. Narumiya. 1999. «Signaling from Rho to the Actin Cytoskeleton through Protein Kinases

- ROCK and LIM-Kinase.» *Science (New York, N.Y.)* 285 (5429): 895-98.
- Majno, G. 1975. «The Healing Hand - Man and wound in the ancient world». Cambridge, MA: *Harvard University Press*.
- Malissein, Emilie, Elise Meunier, Isabelle Lajoie-Mazenc, Claire Médale-Giamarchi, Florence Dalenc, y Sophie F. Doisneau-Sixou. 2013. «RhoA and RhoC Differentially Modulate Estrogen Receptor α Recruitment, Transcriptional Activities, and Expression in Breast Cancer Cells (MCF-7).» *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 139 (12): 2079-88. doi:10.1007/s00432-013-1533-y.
- Marcos-Ramiro, B., D. García-Weber, y J. Millán. 2014. «TNF-Induced Endothelial Barrier Disruption: Beyond Actin and Rho.» *Thrombosis and Haemostasis* 112 (5). doi:10.1160/TH14-04-0299.
- Martorell, Lluís, José Martínez-González, Cristina Rodríguez, Maurizio Gentile, Olivier Calvayrac, y Lina Badimon. 2008. «Thrombin and Protease-Activated Receptors (PARs) in Atherothrombosis.» *Thrombosis and Haemostasis* 99 (2): 305-15. doi:10.1160/TH07-08-0481.
- Matas, Olga B., José Angel Martínez-Menárguez, y Gustavo Egea. 2004. «Association of Cdc42/N-WASP/Arp2/3 Signaling Pathway with Golgi Membranes.» *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 5 (11): 838-46. doi:10.1111/j.1600-0854.2004.00225.x.
- Matsui, T., M. Amano, T. Yamamoto, K. Chihara, M. Nakafuku, M. Ito, T. Nakano, K. Okawa, A. Iwamatsu, y K. Kaibuchi. 1996. «Rho-Associated Kinase, a Novel Serine/threonine Kinase, as a Putative Target for Small GTP Binding Protein Rho.» *The EMBO Journal* 15 (9): 2208-16.
- May, M. J., y A. Ager. 1992. «ICAM-1-Independent Lymphocyte Transmigration across High Endothelium: Differential up-Regulation by Interferon Gamma, Tumor Necrosis Factor-Alpha and Interleukin 1 Beta.» *European Journal of Immunology* 22 (1): 219-26. doi:10.1002/eji.1830220132.
- Mazières, Julien, Vanessa Tillement, Cuider Allal, Carine Clanet, Lisbeth Bobin, Zhi Chen, Said M. Sebt, Gilles Favre, y Anne Pradines. 2005. «Geranylgeranylated, but Not Farnesylated, RhoB Suppresses Ras Transformation of NIH-3T3 Cells.» *Experimental Cell Research* 304 (2): 354-64. doi:10.1016/j.yexcr.2004.10.019.
- McKellar, Gayle E., David W. McCarey, Naveed Sattar, y Iain B. McInnes. 2009. «Role for TNF in Atherosclerosis? Lessons from Autoimmune Disease.» *Nature Reviews. Cardiology* 6 (6): 410-17. doi:10.1038/nrcardio.2009.57.
- McKenzie, Jenny A. G., y Anne J. Ridley. 2007. «Roles of Rho/ROCK and MLCK in TNF-Alpha-Induced Changes in Endothelial Morphology and Permeability.» *Journal of Cellular Physiology* 213 (1): 221-28. doi:10.1002/jcp.21114.
- McVerry, Bryan J., y Joe G. N. Garcia. 2004. «Endothelial Cell Barrier Regulation by Sphingosine 1-Phosphate.» *Journal of Cellular Biochemistry* 92 (6): 1075-85. doi:10.1002/jcb.20088.
- McVerry, Bryan J., Xinqi Peng, Paul M. Hassoun, Saad Sammani, Brett A. Simon, y Joe G. N. Garcia. 2004. «Sphingosine 1-Phosphate Reduces Vascular Leak in Murine and Canine Models of Acute Lung Injury.» *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 170 (9): 987-93. doi:10.1164/rccm.200405-684OC.
- Medzhitov, Ruslan. 2008. «Origin and Physiological Roles of Inflammation.» *Nature* 454 (7203): 428-35. doi:10.1038/nature07201.
- Mehta, Dolly, Gias U. Ahmmed, Biman C. Paria, Michael Holinstat, Tatyana Voyno-Yasenetskaya, Chinnaswamy Tirupathi, Richard D. Minshall, y Asrar B. Malik. 2003. «RhoA Interaction with Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor and Transient Receptor Potential Channel-1 Regulates Ca²⁺ Entry. Role in Signaling Increased Endothelial Permeability.» *The Journal of Biological Chemistry* 278 (35): 33492-500. doi:10.1074/jbc.M302401200.

- Meili, R., C. Ellsworth, S. Lee, T. B. Reddy, H. Ma, y R. A. Firtel. 1999. «Chemoattractant-Mediated Transient Activation and Membrane Localization of Akt/PKB Is Required for Efficient Chemotaxis to cAMP in Dictyostelium.» *The EMBO Journal* 18 (8): 2092-2105. doi:10.1093/emboj/18.8.2092.
- Melendez, Jaime, Kristy Stengel, Xuan Zhou, Bhareesh K. Chauhan, Marcella Debidia, Paul Andreassen, Richard A. Lang, y Yi Zheng. 2011. «RhoA GTPase Is Dispensable for Actomyosin Regulation but Is Essential for Mitosis in Primary Mouse Embryonic Fibroblasts.» *The Journal of Biological Chemistry* 286 (17): 15132-37. doi:10.1074/jbc.C111.229336.
- Metchnikoff, M.E. 1893. «Lectures on the Comparative Pathology of Inflammation». London: *Kegan Paul, Trench & Trubner*.
- Millán, Jaime, Robert J. Cain, Natalia Reglero-Real, Carolina Bigarella, Beatriz Marcos-Ramiro, Laura Fernández-Martín, Isabel Correas, y Anne J. Ridley. 2010. «Adherens Junctions Connect Stress Fibres between Adjacent Endothelial Cells.» *BMC Biology* 8: 11. doi:10.1186/1741-7007-8-11.
- Millán, Jaime, Lindsay Hewlett, Matthew Glyn, Derek Toomre, Peter Clark, y Anne J. Ridley. 2006. «Lymphocyte Transcellular Migration Occurs through Recruitment of Endothelial ICAM-1 to Caveola- and F-Actin-Rich Domains.» *Nature Cell Biology* 8 (2): 113-23. doi:10.1038/ncb1356.
- Moissoglu, Konstadinos, y Martin Alexander Schwartz. 2014. «Spatial and Temporal Control of Rho GTPase Functions.» *Cellular Logistics* 4 (2): e943618. doi:10.4161/21592780.2014.943618.
- Mollenhauer, H. H., D. J. Morré, y L. D. Rowe. 1990. «Alteration of Intracellular Traffic by Monensin; Mechanism, Specificity and Relationship to Toxicity.» *Biochimica Et Biophysica Acta* 1031 (2): 225-46.
- Mooren, Olivia L., Brian J. Galletta, y John A. Cooper. 2012. «Roles for Actin Assembly in Endocytosis.» *Annual Review of Biochemistry* 81: 661-86. doi:10.1146/annurev-biochem-060910-094416.
- Morales-Ruiz, M., D. Fulton, G. Sowa, L. R. Languino, Y. Fujio, K. Walsh, y W. C. Sessa. 2000. «Vascular Endothelial Growth Factor-Stimulated Actin Reorganization and Migration of Endothelial Cells Is Regulated via the Serine/threonine Kinase Akt.» *Circulation Research* 86 (8): 892-96.
- Morales-Ruiz, M., M. J. Lee, S. Zöllner, J. P. Gratton, R. Scotland, I. Shiojima, K. Walsh, T. Hla, y W. C. Sessa. 2001. «Sphingosine 1-Phosphate Activates Akt, Nitric Oxide Production, and Chemotaxis through a Gi Protein/phosphoinositide 3-Kinase Pathway in Endothelial Cells.» *The Journal of Biological Chemistry* 276 (22): 19672-77. doi:10.1074/jbc.M009993200.
- Mrak, R. E., y W. S. Griffin. 2001. «Interleukin-1, Neuroinflammation, and Alzheimer's Disease.» *Neurobiology of Aging* 22 (6): 903-8.
- Munemitsu, S., M. A. Innis, R. Clark, F. McCormick, A. Ullrich, y P. Polakis. 1990. «Molecular Cloning and Expression of a G25K cDNA, the Human Homolog of the Yeast Cell Cycle Gene CDC42.» *Molecular and Cellular Biology* 10 (11): 5977-82.
- Naikawadi, Ram P., Ni Cheng, Stephen M. Vogel, Feng Qian, Dianqing Wu, Asrar B. Malik, y Richard D. Ye. 2012. «A Critical Role for Phosphatidylinositol (3,4,5)-Trisphosphate-Dependent Rac Exchanger 1 in Endothelial Junction Disruption and Vascular Hyperpermeability.» *Circulation Research* 111 (12): 1517-27. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.273078.
- Narumiya, S. 1996. «The Small GTPase Rho: Cellular Functions and Signal Transduction.» *Journal of Biochemistry* 120 (2): 215-28.
- Nobes, C. D., y A. Hall. 1995. «Rho, Rac, and cdc42 GTPases Regulate the Assembly of Multimolecular Focal Complexes Associated with Actin Stress Fibers, Lamellipodia, and Filopodia.» *Cell* 81 (1): 53-62.
- Nwariaku, Fiemu E., Zijuan Liu, Xudong Zhu, Dorit Nahari, Christine Ingle, Ru Feng Wu, Ying Gu, George Sarosi, y Lance S. Terada. 2004. «NADPH Oxidase Mediates Vascular Endothelial

- Cadherin Phosphorylation and Endothelial Dysfunction.» *Blood* 104 (10): 3214-20. doi:10.1182/blood-2004-05-1868.
- Oeste, Clara L., Mario Pinar, Kay O. Schink, Javier Martínez-Turrión, Harald Stenmark, Miguel A. Peñalva, y Dolores Pérez-Sala. 2014. «An Isoprenylation and Palmitoylation Motif Promotes Intraluminal Vesicle Delivery of Proteins in Cells from Distant Species.» *PloS One* 9 (9): e107190. doi:10.1371/journal.pone.0107190.
- Offermanns, S., K. L. Laugwitz, K. Spicher, y G. Schultz. 1994. «G Proteins of the G12 Family Are Activated via Thromboxane A2 and Thrombin Receptors in Human Platelets.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (2): 504-8.
- Olofsson, B., P. Chardin, N. Touchot, A. Zahraoui, y A. Tavitian. 1988. «Expression of the Ras-Related *ralA*, *rho12* and *Rab* Genes in Adult Mouse Tissues.» *Oncogene* 3 (2): 231-34.
- Olson, M. F., A. Ashworth, y A. Hall. 1995. «An Essential Role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in Cell Cycle Progression through G1.» *Science (New York, N.Y.)* 269 (5228): 1270-72.
- Ota, Takahide, Masayo Maeda, Mayumi Okamoto, y Masaaki Tatsuka. 2015. «Positive Regulation of Rho GTPase Activity by RhoGDIs as a Result of Their Direct Interaction with GAPs.» *BMC Systems Biology* 9: 3. doi:10.1186/s12918-015-0143-5.
- Palamidessi, Andrea, Emanuela Frittoli, Massimiliano Garré, Mario Faretta, Marina Mione, Ilaria Testa, Alberto Diaspro, Letizia Lanzetti, Giorgio Scita, y Pier Paolo Di Fiore. 2008. «Endocytic Trafficking of Rac Is Required for the Spatial Restriction of Signaling in Cell Migration.» *Cell* 134 (1): 135-47. doi:10.1016/j.cell.2008.05.034.
- Pal, Srabani, Ashish Bhattacharjee, Asif Ali, Narayan C. Mandal, Subhash C. Mandal, y Mahadeb Pal. 2014. «Chronic Inflammation and Cancer: Potential Chemoprevention through Nuclear Factor Kappa B and p53 Mutual Antagonism.» *Journal of Inflammation (London, England)* 11: 23. doi:10.1186/1476-9255-11-23.
- Paria, Biman C., Stephen M. Vogel, Gias U. Ahmmed, Setara Alamgir, Jennifer Shroff, Asrar B. Malik, y Chinnaswamy Tirupathi. 2004. «Tumor Necrosis Factor-Alpha-Induced TRPC1 Expression Amplifies Store-Operated Ca²⁺ Influx and Endothelial Permeability.» *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 287 (6): L1303-13. doi:10.1152/ajplung.00240.2004.
- Paterson, H. F., A. J. Self, M. D. Garrett, I. Just, K. Aktories, y A. Hall. 1990. «Microinjection of Recombinant p21rho Induces Rapid Changes in Cell Morphology.» *The Journal of Cell Biology* 111 (3): 1001-7.
- Pelham, H. R. 1991. «Multiple Targets for Brefeldin A.» *Cell* 67 (3): 449-51.
- Pérez-Sala, Dolores, Patricia Boya, Irene Ramos, Mónica Herrera, y Konstantinos Stamatakis. 2009. «The C-Terminal Sequence of RhoB Directs Protein Degradation through an Endo-Lysosomal Pathway.» *PloS One* 4 (12): e8117. doi:10.1371/journal.pone.0008117.
- Petäjä, Jari. 2011. «Inflammation and Coagulation. An Overview.» *Thrombosis Research* 127 Suppl 2 (enero): S34-37. doi:10.1016/S0049-3848(10)70153-5.
- Pober, Jordan S., y William C. Sessa. 2007. «Evolving Functions of Endothelial Cells in Inflammation.» *Nature Reviews. Immunology* 7 (10): 803-15. doi:10.1038/nri2171.
- Popović, Milan, Katarina Smiljanić, Branislava Dobutović, Tatiana Syrovets, Thomas Simmet, y Esma R. Isenović. 2012. «Thrombin and Vascular Inflammation.» *Molecular and Cellular Biochemistry* 359 (1-2): 301-13. doi:10.1007/s11010-011-1024-x.
- Posor, York, Marielle Eichhorn-Gruenig, Dmytro Puchkov, Johannes Schöneberg, Alexander Ullrich, André Lampe, Rainer Müller, et al. 2013. «Spatiotemporal Control of Endocytosis by Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphate.» *Nature* 499 (7457): 233-37. doi:10.1038/nature12360.

- Prendergast, G. C., R. Khosravi-Far, P. A. Solski, H. Kurzawa, P. F. Lebowitz, y C. J. Der. 1995. «Critical Role of Rho in Cell Transformation by Oncogenic Ras.» *Oncogene* 10 (12): 2289-96.
- Rahman, A., K. N. Anwar, A. L. True, y A. B. Malik. 1999. «Thrombin-Induced p65 Homodimer Binding to Downstream NF-Kappa B Site of the Promoter Mediates Endothelial ICAM-1 Expression and Neutrophil Adhesion.» *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 162 (9): 5466-76.
- Rajakylä, Eeva Kaisa, y Maria K. Vartiainen. 2014. «Rho, Nuclear Actin, and Actin-Binding Proteins in the Regulation of Transcription and Gene Expression.» *Small GTPases* 5: e27539. doi:10.4161/sgtp.27539.
- Raz, Limor, Quan-Guang Zhang, Cai-feng Zhou, Dong Han, Priya Gulati, Li-cai Yang, Fang Yang, Rui-min Wang, y Darrell W. Brann. 2010. «Role of Rac1 GTPase in NADPH Oxidase Activation and Cognitive Impairment Following Cerebral Ischemia in the Rat.» *PLoS One* 5 (9): e12606. doi:10.1371/journal.pone.0012606.
- Reed, Shawna C. O., Alisa W. Serio, y Matthew D. Welch. 2012. «Rickettsia Parkeri Invasion of Diverse Host Cells Involves an Arp2/3 Complex, WAVE Complex and Rho-Family GTPase-Dependent Pathway.» *Cellular Microbiology* 14 (4): 529-45. doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01739.x.
- Reglero-Real, Natalia, Adrián Alvarez-Varela, Eva Cernuda-Morollón, Jorge Feito, Beatriz Marcos-Ramiro, Laura Fernández-Martín, María José Gómez-Lechón, et al. 2014. «Apicobasal Polarity Controls Lymphocyte Adhesion to Hepatic Epithelial Cells.» *Cell Reports* 8 (6): 1879-93. doi:10.1016/j.celrep.2014.08.007.
- Reglero-Real, Natalia, Beatriz Marcos-Ramiro, y Jaime Millán. 2012. «Endothelial Membrane Reorganization during Leukocyte Extravasation.» *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 69 (18): 3079-99. doi:10.1007/s00018-012-0987-4.
- Ren, X. D., y M. A. Schwartz. 2000. «Determination of GTP Loading on Rho.» *Methods in Enzymology* 325: 264-72.
- Ridley, A. 2000. «Rho GTPases. Integrating Integrin Signaling.» *The Journal of Cell Biology* 150 (4): F107-9.
- Ridley, A. J. 1995. «Rho-Related Proteins: Actin Cytoskeleton and Cell Cycle.» *Current Opinion in Genetics & Development* 5 (1): 24-30.
- Ridley, A. J. 2001. «Rho Family Proteins: Coordinating Cell Responses.» *Trends in Cell Biology* 11 (12): 471-77.
- Ridley, A. J. 2013. «RhoA, RhoB and RhoC Have Different Roles in Cancer Cell Migration.» *Journal of Microscopy* 251 (3): 242-49. doi:10.1111/jmi.12025.
- Ridley, A. J., W. E. Allen, M. Peppelenbosch, y G. E. Jones. 1999. «Rho Family Proteins and Cell Migration.» *Biochemical Society Symposium* 65: 111-23.
- Ridley, A. J., P. M. Comoglio, y A. Hall. 1995. «Regulation of Scatter Factor/hepatocyte Growth Factor Responses by Ras, Rac, and Rho in MDCK Cells.» *Molecular and Cellular Biology* 15 (2): 1110-22.
- Ridley, A. J., y A. Hall. 1992. «The Small GTP-Binding Protein Rho Regulates the Assembly of Focal Adhesions and Actin Stress Fibers in Response to Growth Factors.» *Cell* 70 (3): 389-99.
- Ridley, A. J., H. F. Paterson, C. L. Johnston, D. Diekmann, y A. Hall. 1992. «The Small GTP-Binding Protein Rac Regulates Growth Factor-Induced Membrane Ruffling.» *Cell* 70 (3): 401-10.
- Ridley, Anne J. 2006. «Rho GTPases and Actin Dynamics in Membrane Protrusions and Vesicle Trafficking.» *Trends in Cell Biology* 16 (10): 522-29. doi:10.1016/j.tcb.2006.08.006.
- Ridley, Anne J., Martin A. Schwartz, Keith Burridge, Richard A. Firtel, Mark H. Ginsberg, Gary Borisy, J. Thomas Parsons, y Alan Rick Horwitz. 2003. «Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back.» *Science (New York, N.Y.)* 302 (5651): 1704-9. doi:10.1126/science.1092053.

- Rolfe, Barbara E., Nathalie F. Worth, Cameron J. World, Julie H. Campbell, y Gordon R. Campbell. 2005. «Rho and Vascular Disease.» *Atherosclerosis* 183 (1): 1-16. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2005.04.023.
- Rolli-Derkinderen, Malvyne, Vincent Sauzeau, Laurent Boyer, Emmanuel Lemichez, Céline Baron, Daniel Henrion, Gervaise Loirand, y Pierre Pacaud. 2005. «Phosphorylation of Serine 188 Protects RhoA from Ubiquitin/proteasome-Mediated Degradation in Vascular Smooth Muscle Cells.» *Circulation Research* 96 (11): 1152-60. doi:10.1161/01.RES.0000170084.88780.ea.
- Rosenfeldt, Hans, Maria Domenica Castellone, Paul A. Randazzo, y J. Silvio Gutkind. 2006. «Rac Inhibits Thrombin-Induced Rho Activation: Evidence of a Pak-Dependent GTPase Crosstalk.» *Journal of Molecular Signaling* 1: 8. doi:10.1186/1750-2187-1-8.
- Rossman, Kent L., Channing J. Der, y John Sondek. 2005. «GEF Means Go: Turning on RHO GTPases with Guanine Nucleotide-Exchange Factors.» *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 6 (2): 167-80. doi:10.1038/nrm1587.
- Roth, G. J. 1992. «Platelets and Blood Vessels: The Adhesion Event.» *Immunology Today* 13 (3): 100-105. doi:10.1016/0167-5699(92)90150-6.
- Rust, Michael J., Mark Bates, y Xiaowei Zhuang. 2006. «Sub-Diffraction-Limit Imaging by Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM).» *Nature Methods* 3 (10): 793-95. doi:10.1038/nmeth929.
- Sahai, Erik, y Christopher J. Marshall. 2002. «ROCK and Dia Have Opposing Effects on Adherens Junctions Downstream of Rho.» *Nature Cell Biology* 4 (6): 408-15. doi:10.1038/ncb796.
- Sandilands, Emma, Christophe Cans, Valerie J. Fincham, Valerie G. Brunton, Harry Mellor, George C. Prendergast, Jim C. Norman, Giulio Superti-Furga, y Margaret C. Frame. 2004. «RhoB and Actin Polymerization Coordinate Src Activation with Endosome-Mediated Delivery to the Membrane.» *Developmental Cell* 7 (6): 855-69. doi:10.1016/j.devcel.2004.09.019.
- Sandoval, R., A. B. Malik, R. D. Minshall, P. Kouklis, C. A. Ellis, y C. Tiruppathi. 2001. «Ca(2+) Signalling and PKCalpha Activate Increased Endothelial Permeability by Disassembly of VE-Cadherin Junctions.» *The Journal of Physiology* 533 (Pt 2): 433-45.
- Sasaki, T., J. Irie-Sasaki, R. G. Jones, A. J. Oliveira-dos-Santos, W. L. Stanford, B. Bolon, A. Wakeham, et al. 2000. «Function of PI3Kgamma in Thymocyte Development, T Cell Activation, and Neutrophil Migration.» *Science (New York, N.Y.)* 287 (5455): 1040-46.
- Scaldaferri, Franco, Stefano Lancellotti, Marco Pizzoferrato, y Raimondo De Cristofaro. 2011. «Haemostatic System in Inflammatory Bowel Diseases: New Players in Gut Inflammation.» *World Journal of Gastroenterology: WJG* 17 (5): 594-608. doi:10.3748/wjg.v17.i5.594.
- Schlegel, Nicolas, y Jens Waschke. 2014. «cAMP with Other Signaling Cues Converges on Rac1 to Stabilize the Endothelial Barrier- a Signaling Pathway Compromised in Inflammation.» *Cell and Tissue Research* 355 (3): 587-96. doi:10.1007/s00441-013-1755-y.
- Schmidt, Tracy Thennes, Mohammad Tauseef, Lili Yue, Marcelo G. Bonini, Joachim Gothert, Tang-Long Shen, Jun-Lin Guan, Sanda Predescu, Ruxana Sadikot, y Dolly Mehta. 2013. «Conditional Deletion of FAK in Mice Endothelium Disrupts Lung Vascular Barrier Function due to Destabilization of RhoA and Rac1 Activities.» *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 305 (4): L291-300. doi:10.1152/ajplung.00094.2013.
- Schuebel, K. E., N. Movilla, J. L. Rosa, y X. R. Bustelo. 1998. «Phosphorylation-Dependent and Constitutive Activation of Rho Proteins by Wild-Type and Oncogenic Vav-2.» *The EMBO Journal* 17 (22): 6608-21. doi:10.1093/emboj/17.22.6608.
- Seifert, Jason P., Michele R. Wing, Jason T. Snyder, Svetlana Gershburg, John Sondek, y T. Kendall Harden. 2004. «RhoA Activates Purified Phospholipase C-Epsilon by a Guanine Nucleotide-Dependent Mechanism.» *The Journal of Biological Chemistry* 279 (46): 47992-97. doi:10.1074/jbc.M407111200.

- Servant, G., O. D. Weiner, P. Herzmark, T. Balla, J. W. Sedat, y H. R. Bourne. 2000. «Polarization of Chemoattractant Receptor Signaling during Neutrophil Chemotaxis.» *Science (New York, N.Y.)* 287 (5455): 1037-40.
- Shao, Feng, y Jack E. Dixon. 2003. «YopT Is a Cysteine Protease Cleaving Rho Family GTPases.» *Advances in Experimental Medicine and Biology* 529: 79-84. doi:10.1007/0-306-48416-1_14.
- Shibuya, Masato, Shunsaku Hirai, Minoru Seto, Shin-ichi Satoh, Eiichi Ohtomo, y Fasudil Ischemic Stroke Study Group. 2005. «Effects of Fasudil in Acute Ischemic Stroke: Results of a Prospective Placebo-Controlled Double-Blind Trial.» *Journal of the Neurological Sciences* 238 (1-2): 31-39. doi:10.1016/j.jns.2005.06.003.
- Shi, Jianjian, y Lei Wei. 2013. «Rho Kinases in Cardiovascular Physiology and Pathophysiology: The Effect of Fasudil.» *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 62 (4): 341-54. doi:10.1097/FJC.0b013e3182a3718f.
- Shiojima, Ichiro, y Kenneth Walsh. 2002. «Role of Akt Signaling in Vascular Homeostasis and Angiogenesis.» *Circulation Research* 90 (12): 1243-50.
- Shirvaikar, Neeta, Leah A. Marquez-Curtis, Mariusz Z. Ratajczak, y Anna Janowska-Wieczorek. 2011. «Hyaluronic Acid and Thrombin Upregulate MT1-MMP through PI3K and Rac-1 Signaling and Prime the Homing-Related Responses of Cord Blood Hematopoietic Stem/progenitor Cells.» *Stem Cells and Development* 20 (1): 19-30. doi:10.1089/scd.2010.0118.
- Singleton, Patrick A., Steven M. Dudek, Shwu-Fan Ma, y Joe G. N. Garcia. 2006. «Transactivation of Sphingosine 1-Phosphate Receptors Is Essential for Vascular Barrier Regulation. Novel Role for Hyaluronan and CD44 Receptor Family.» *The Journal of Biological Chemistry* 281 (45): 34381-93. doi:10.1074/jbc.M603680200.
- Small, J. Victor, Theresia Stradal, Emmanuel Vignal, y Klemens Rottner. 2002. «The Lamellipodium: Where Motility Begins.» *Trends in Cell Biology* 12 (3): 112-20.
- Somanath, Payaningal R., y Tatiana V. Byzova. 2009. «14-3-3beta-Rac1-p21 Activated Kinase Signaling Regulates Akt1-Mediated Cytoskeletal Organization, Lamellipodia Formation and Fibronectin Matrix Assembly.» *Journal of Cellular Physiology* 218 (2): 394-404. doi:10.1002/jcp.21612.
- Spindler, Volker, Nicolas Schlegel, y Jens Waschke. 2010. «Role of GTPases in Control of Microvascular Permeability.» *Cardiovascular Research* 87 (2): 243-53. doi:10.1093/cvr/cvq086.
- Stamatakis, Konstantinos, Eva Cernuda-Morollón, Octavio Hernández-Perera, y Dolores Pérez-Sala. 2002. «Isoprenylation of RhoB Is Necessary for Its Degradation. A Novel Determinant in the Complex Regulation of RhoB Expression by the Mevalonate Pathway.» *The Journal of Biological Chemistry* 277 (51): 49389-96. doi:10.1074/jbc.M204049200.
- Stolpen, A. H., E. C. Guinan, W. Fiers, y J. S. Pober. 1986. «Recombinant Tumor Necrosis Factor and Immune Interferon Act Singly and in Combination to Reorganize Human Vascular Endothelial Cell Monolayers.» *The American Journal of Pathology* 123 (1): 16-24.
- Suárez Ferrer, Cristina, María Isabel Vera Mendoza, Leticia Amo San Román, Yago González Lama, Marta Calvo Moya, Mercedes García Casas, y Luis Abreu García. 2012. «[Risk of thromboembolic phenomena in patients with inflammatory bowel disease].» *Gastroenterología Y Hepatología* 35 (9): 634-39. doi:10.1016/j.gastrohep.2012.07.003.
- Sugihara, K., N. Nakatsuji, K. Nakamura, K. Nakao, R. Hashimoto, H. Otani, H. Sakagami, et al. 1998. «Rac1 Is Required for the Formation of Three Germ Layers during Gastrulation.» *Oncogene* 17 (26): 3427-33. doi:10.1038/sj.onc.1202595.
- Sukumvanich, P., V. DesMarais, C. V. Sarmiento, Y. Wang, I. Ichetovkin, G. Mounieimne, S. Almo, y J. Condeelis. 2004. «Cellular Localization of Activated N-WASP Using a Conformation-Sensitive Antibody.» *Cell Motility and the Cytoskeleton* 59 (2): 141-52. doi:10.1002/cm.20030.

- Tauseef, Mohammad, Vidisha Kini, Nebojsa Knezevic, Melissa Brannan, Ram Ramchandaran, Henrik Fyrst, Julie Saba, Stephen M. Vogel, Asrar B. Malik, y Dolly Mehta. 2008. «Activation of Sphingosine Kinase-1 Reverses the Increase in Lung Vascular Permeability through Sphingosine-1-Phosphate Receptor Signaling in Endothelial Cells.» *Circulation Research* 103 (10): 1164-72. doi:10.1161/01.RES.0000338501.84810.51.
- Taylor, S. J., H. Z. Chae, S. G. Rhee, y J. H. Exton. 1991. «Activation of the Beta 1 Isozyme of Phospholipase C by Alpha Subunits of the Gq Class of G Proteins.» *Nature* 350 (6318): 516-18. doi:10.1038/350516a0.
- Thompson, Paul W., Anna M. Randi, y Anne J. Ridley. 2002. «Intercellular Adhesion Molecule (ICAM)-1, but Not ICAM-2, Activates RhoA and Stimulates c-Fos and rhoA Transcription in Endothelial Cells.» *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 169 (2): 1007-13.
- Tiruppathi, C., T. Naqvi, R. Sandoval, D. Mehta, y A. B. Malik. 2001. «Synergistic Effects of Tumor Necrosis Factor-Alpha and Thrombin in Increasing Endothelial Permeability.» *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 281 (4): L958-68.
- Turner, C. E., J. R. Glenney, y K. Burridge. 1990. «Paxillin: A New Vinculin-Binding Protein Present in Focal Adhesions.» *The Journal of Cell Biology* 111 (3): 1059-68.
- Valero, Ruth A., Clara L. Oeste, Konstantinos Stamatakis, Irene Ramos, Mónica Herrera, Patricia Boya, y Dolores Pérez-Sala. 2010. «Structural Determinants Allowing Endolysosomal Sorting and Degradation of Endosomal GTPases.» *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 11 (9): 1221-33. doi:10.1111/j.1600-0854.2010.01091.x.
- Vallabhapurapu, Sivakumar, y Michael Karin. 2009. «Regulation and Function of NF-kappaB Transcription Factors in the Immune System.» *Annual Review of Immunology* 27: 693-733. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132641.
- Van Buul, J. D., M. Fernandez-Borja, E. C. Anthony, y P. L. Hordijk. 2005. «Expression and Localization of NOX2 and NOX4 in Primary Human Endothelial Cells.» *Antioxidants & Redox Signaling* 7 (3-4): 308-17. doi:10.1089/ars.2005.7.308.
- Vandenabeele, Peter, Wim Declercq, Franky Van Herreweghe, y Tom Vanden Berghe. 2010. «The Role of the Kinases RIP1 and RIP3 in TNF-Induced Necrosis.» *Science Signaling* 3 (115): re4. doi:10.1126/scisignal.3115re4.
- Vanhaesebroeck, B., y D. R. Alessi. 2000. «The PI3K-PDK1 Connection: More than Just a Road to PKB.» *The Biochemical Journal* 346 Pt 3 (marzo): 561-76.
- van Nieuw Amerongen, G. P., C. M. L. Beckers, I. D. Achekar, S. Zeeman, R. J. P. Musters, y V. W. M. van Hinsbergh. 2007. «Involvement of Rho Kinase in Endothelial Barrier Maintenance.» *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27 (11): 2332-39. doi:10.1161/ATVBAHA.107.152322.
- van Nieuw Amerongen, G. P., M. A. Vermeer, y V. W. van Hinsbergh. 2000. «Role of RhoA and Rho Kinase in Lysophosphatidic Acid-Induced Endothelial Barrier Dysfunction.» *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 20 (12): E127-33.
- van Rahden, Vanessa A., Kristina Brand, Juliane Najm, Joerg Heeren, Suzanne R. Pfeffer, Thomas Braulke, y Kerstin Kutsche. 2012. «The 5-Phosphatase OCRL Mediates Retrograde Transport of the Mannose 6-Phosphate Receptor by Regulating a Rac1-Cofilin Signalling Module.» *Human Molecular Genetics* 21 (23): 5019-38. doi:10.1093/hmg/dds343.
- van Rijssel, Jos, Jeffrey Kroon, Mark Hoogenboezem, Floris P. J. van Alphen, Renske J. de Jong, Elena Kostadinova, Dirk Geerts, Peter L. Hordijk, y Jaap D. van Buul. 2012. «The Rho-Guanine Nucleotide Exchange Factor Trio Controls Leukocyte Transendothelial Migration by Promoting Docking Structure Formation.» *Molecular Biology of the Cell* 23 (15): 2831-44. doi:10.1091/mbc.E11-11-0907.
- van Wetering, Sandra, Jaap D. van Buul, Safira Quik, Frederik P. J. Mul, Eloise C. Anthony, Jean-Paul ten

- Klooster, John G. Collard, y Peter L. Hordijk. 2002. «Reactive Oxygen Species Mediate Rac-Induced Loss of Cell-Cell Adhesion in Primary Human Endothelial Cells.» *Journal of Cell Science* 115 (Pt 9): 1837-46.
- van Wetering, Sandra, Nadia van den Berk, Jaap D. van Buul, Frederik P. J. Mul, Ingrid Lommerse, Rogier Mous, Jean-Paul ten Klooster, Jaap-Jan Zwaginga, y Peter L. Hordijk. 2003. «VCAM-1-Mediated Rac Signaling Controls Endothelial Cell-Cell Contacts and Leukocyte Transmigration.» *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 285 (2): C343-52. doi:10.1152/ajpcell.00048.2003.
- Vega, Francisco M., Audrey Colomba, Nicolas Reymond, Mairian Thomas, y Anne J. Ridley. 2012. «RhoB Regulates Cell Migration through Altered Focal Adhesion Dynamics.» *Open Biology* 2 (5): 120076. doi:10.1098/rsob.120076.
- Vega, Francisco M., Gilbert Fruhwirth, Tony Ng, y Anne J. Ridley. 2011. «RhoA and RhoC Have Distinct Roles in Migration and Invasion by Acting through Different Targets.» *The Journal of Cell Biology* 193 (4): 655-65. doi:10.1083/jcb.201011038.
- Vega, Francisco M., y Anne J. Ridley. 2008. «Rho GTPases in Cancer Cell Biology.» *FEBS Letters* 582 (14): 2093-2101. doi:10.1016/j.febslet.2008.04.039.
- Vega, Francisco M., Mairian Thomas, Nicolas Reymond, y Anne J. Ridley. 2015. «The Rho GTPase RhoB Regulates Cadherin Expression and Epithelial Cell-Cell Interaction.» *Cell Communication and Signaling: CCS* 13 (1): 6. doi:10.1186/s12964-015-0085-y.
- Vemula, Sasidhar, Jianjian Shi, Philip Hanneman, Lei Wei, y Reuben Kapur. 2010. «ROCK1 Functions as a Suppressor of Inflammatory Cell Migration by Regulating PTEN Phosphorylation and Stability.» *Blood* 115 (9): 1785-96. doi:10.1182/blood-2009-08-237222.
- Vlahos, C. J., W. F. Matter, K. Y. Hui, y R. F. Brown. 1994. «A Specific Inhibitor of Phosphatidylinositol 3-Kinase, 2-(4-Morpholinyl)-8-Phenyl-4H-1-Benzopyran-4-One (LY294002).» *The Journal of Biological Chemistry* 269 (7): 5241-48.
- Vogel, S. M., X. Gao, D. Mehta, R. D. Ye, T. A. John, P. Andrade-Gordon, C. Tiruppathi, y A. B. Malik. 2000. «Abrogation of Thrombin-Induced Increase in Pulmonary Microvascular Permeability in PAR-1 Knockout Mice.» *Physiological Genomics* 4 (2): 137-45.
- Vouret-Craviari, Valérie, Christine Bourcier, Etienne Boulter, y Ellen van Obberghen-Schilling. 2002. «Distinct Signals via Rho GTPases and Src Drive Shape Changes by Thrombin and Sphingosine-1-Phosphate in Endothelial Cells.» *Journal of Cell Science* 115 (Pt 12): 2475-84.
- Vouret-Craviari, V., P. Boquet, J. Pouyssegur, y E. Van Obberghen-Schilling. 1998. «Regulation of the Actin Cytoskeleton by Thrombin in Human Endothelial Cells: Role of Rho Proteins in Endothelial Barrier Function.» *Molecular Biology of the Cell* 9 (9): 2639-53.
- Waller, Bradley J., y Arthur S. Alberts. 2003. «The Formins: Active Scaffolds That Remodel the Cytoskeleton.» *Trends in Cell Biology* 13 (8): 435-46.
- Waller, Bradley J., Aaron D. Deward, James H. Resau, y Arthur S. Alberts. 2007. «RhoB and the Mammalian Diaphanous-Related Formin mDia2 in Endosome Trafficking.» *Experimental Cell Research* 313 (3): 560-71. doi:10.1016/j.yexcr.2006.10.033.
- Wang, Lei, Linda Yang, Yongneng Luo, y Yi Zheng. 2003. «A Novel Strategy for Specifically down-Regulating Individual Rho GTPase Activity in Tumor Cells.» *The Journal of Biological Chemistry* 278 (45): 44617-25. doi:10.1074/jbc.M308929200.
- Wang, P., A. D. Verin, A. Birukova, L. I. Gilbert-McClain, K. Jacobs, y J. G. Garcia. 2001. «Mechanisms of Sodium Fluoride-Induced Endothelial Cell Barrier Dysfunction: Role of MLC Phosphorylation.» *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 281 (6): L1472-83.

- Watanabe, N., T. Kato, A. Fujita, T. Ishizaki, y S. Narumiya. 1999. «Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-Induced Actin Reorganization.» *Nature Cell Biology* 1 (3): 136-43. doi:10.1038/11056.
- Watanabe, N., P. Madaule, T. Reid, T. Ishizaki, G. Watanabe, A. Kakizuka, Y. Saito, K. Nakao, B. M. Jockusch, y S. Narumiya. 1997. «p140mDia, a Mammalian Homolog of Drosophila Diaphanous, Is a Target Protein for Rho Small GTPase and Is a Ligand for Profilin.» *The EMBO Journal* 16 (11): 3044-56. doi:10.1093/emboj/16.11.3044.
- Weernink, Paschal A. Oude, Konstantinos Meletiadis, Silvia Hommeltenberg, Matthias Hinz, Hisamitsu Ishihara, Martina Schmidt, y Karl H. Jakobs. 2004. «Activation of Type I Phosphatidylinositol 4-Phosphate 5-Kinase Isoforms by the Rho GTPases, RhoA, Rac1, and Cdc42.» *The Journal of Biological Chemistry* 279 (9): 7840-49. doi:10.1074/jbc.M312737200.
- Wei, Lei, Kyoko Imanaka-Yoshida, Lu Wang, Song Zhan, Michael D. Schneider, Francesco J. DeMayo, y Robert J. Schwartz. 2002. «Inhibition of Rho Family GTPases by Rho GDP Dissociation Inhibitor Disrupts Cardiac Morphogenesis and Inhibits Cardiomyocyte Proliferation.» *Development (Cambridge, England)* 129 (7): 1705-14.
- Wennerberg, Krister, y Channing J. Der. 2004. «Rho-Family GTPases: It's Not Only Rac and Rho (and I like It).» *Journal of Cell Science* 117 (Pt 8): 1301-12. doi:10.1242/jcs.01118.
- Wheeler, Ann P., y Anne J. Ridley. 2004. «Why Three Rho Proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and Cell Motility.» *Experimental Cell Research* 301 (1): 43-49. doi:10.1016/j.yexcr.2004.08.012.
- Wheeler, Ann P., y Anne J. Ridley. 2007. «RhoB Affects Macrophage Adhesion, Integrin Expression and Migration.» *Experimental Cell Research* 313 (16): 3505-16. doi:10.1016/j.yexcr.2007.07.014.
- Wherlock, Matthew, Alexandra Gampel, Clare Futter, y Harry Mellor. 2004. «Farnesyltransferase Inhibitors Disrupt EGF Receptor Traffic through Modulation of the RhoB GTPase.» *Journal of Cell Science* 117 (Pt 15): 3221-31. doi:10.1242/jcs.01193.
- Wick, M. J., L. Q. Dong, R. A. Riojas, F. J. Ramos, y F. Liu. 2000. «Mechanism of Phosphorylation of Protein Kinase B/Akt by a Constitutively Active 3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase-1.» *The Journal of Biological Chemistry* 275 (51): 40400-406. doi:10.1074/jbc.M003937200.
- Wing, Michele R., Jason T. Snyder, John Sondek, y T. Kendall Harden. 2003. «Direct Activation of Phospholipase C-Epsilon by Rho.» *The Journal of Biological Chemistry* 278 (42): 41253-58. doi:10.1074/jbc.M306904200.
- Wojciak-Stothard, Beata, y Anne J. Ridley. 2002. «Rho GTPases and the Regulation of Endothelial Permeability.» *Vascular Pharmacology* 39 (4-5): 187-99.
- Wójciak-Stothard, B., A. Entwistle, R. Garg, y A. J. Ridley. 1998. «Regulation of TNF-Alpha-Induced Reorganization of the Actin Cytoskeleton and Cell-Cell Junctions by Rho, Rac, and Cdc42 in Human Endothelial Cells.» *Journal of Cellular Physiology* 176 (1): 150-65. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(199807)176:1<150::AID-JCP17>3.0.CO;2-B.
- Wójciak-Stothard, B., S. Potempa, T. Eichholtz, y A. J. Ridley. 2001. «Rho and Rac but Not Cdc42 Regulate Endothelial Cell Permeability.» *Journal of Cell Science* 114 (Pt 7): 1343-55.
- Wolf, Sabine I., Sarah Howat, David J. Abraham, Jeremy D. Pearson, y Charlotte Lawson. 2013. «Agonistic Anti-ICAM-1 Antibodies in Scleroderma: Activation of Endothelial pro-Inflammatory Cascades.» *Vascular Pharmacology* 59 (1-2): 19-26. doi:10.1016/j.vph.2013.05.002.
- Wu, Chia-Yen C., Eileen S. Carpenter, Kenneth K. Takeuchi, Christopher J. Halbrook, Louise V. Peverley, Harold Bien, Jason C. Hall, et al. 2014. «PI3K Regulation of RAC1 Is Required for KRAS-Induced Pancreatic Tumorigenesis in Mice.» *Gastroenterology* 147 (6): 1405-16.e7. doi:10.1053/j.gastro.2014.08.032.

- Yang, N., O. Higuchi, K. Ohashi, K. Nagata, A. Wada, K. Kangawa, E. Nishida, y K. Mizuno. 1998. «Cofilin Phosphorylation by LIM-Kinase 1 and Its Role in Rac-Mediated Actin Reorganization.» *Nature* 393 (6687): 809-12. doi:10.1038/31735.
- Yang, Yongzhi, Yanlei Ma, Chenzhang Shi, Hongqi Chen, Huizhen Zhang, Niwei Chen, Peng Zhang, et al. 2013. «Overexpression of miR-21 in Patients with Ulcerative Colitis Impairs Intestinal Epithelial Barrier Function through Targeting the Rho GTPase RhoB.» *Biochemical and Biophysical Research Communications* 434 (4): 746-52. doi:10.1016/j.bbrc.2013.03.122.
- Yarar, Defne, Clare M. Waterman-Storer, y Sandra L. Schmid. 2005. «A Dynamic Actin Cytoskeleton Functions at Multiple Stages of Clathrin-Mediated Endocytosis.» *Molecular Biology of the Cell* 16 (2): 964-75. doi:10.1091/mbc.E04-09-0774.
- Zalcman, G., V. Closson, G. Linarès-Cruz, F. Lerebours, N. Honoré, A. Tavitian, y B. Olofsson. 1995. «Regulation of Ras-Related RhoB Protein Expression during the Cell Cycle.» *Oncogene* 10 (10): 1935-45.
- Zimmerman, G. A., M. R. Elstad, D. E. Lorant, T. M. McIntyre, S. M. Prescott, M. K. Topham, A. S. Weyrich, y R. E. Whatley. 1996. «Platelet-Activating Factor (PAF): Signalling and Adhesion in Cell-Cell Interactions.» *Advances in Experimental Medicine and Biology* 416: 297-304.

ANEXO

Figure S1. Changes in RhoB protein expression in response to inflammatory cytokines in primary human microvascular endothelial cells, endothelial and epithelial cell lines. (A)

HUVECs were starved for 12 h and stimulated at different times with IL-1 β , lysed, and immunoblotted for the indicated antibodies. Right graphs quantify the expression changes of RhoA, RhoB and RhoC in response to IL-1 β , and represents the mean + S.E.M. of three different experiments. ***, p-value < 0.001; (B) Human dermal microvascular endothelial cells were starved for 12 h and stimulated at different times with TNF, lysed, and immunoblotted for the indicated antibodies. (C) Human bone marrow endothelial cells (HBMEC) were starved for 12 h, stimulated at different times with TNF and lysed. Western blot was performed for the indicated proteins. (D) EA.hy926, HeLa and HepG2 cells were left unstimulated or stimulated with TNF for 7 h, lysed and RhoB detected by western blot. (E) HUVECs were stimulated with TNF for 7 h when indicated in the presence or absence of the indicated inhibitors. Cells were lysed and western blot was performed for the indicated proteins. Bottom graph shows quantification of RhoB expression and represents the mean + S.E.M. of three different experiments. (F) Relative expression levels of RhoA, RhoB and RhoC in HUVECs. Three different lysates of HEK 293 cells containing similar levels of exogenous RhoA, RhoB or RhoC tagged with myc were generated as internal standards (left panel). One lysate from unstimulated HUVECs and two lysates from TNF-stimulated HUVECs were blotted with antibodies against RhoA, RhoB or RhoC, together with the HEK293 lysate containing the corresponding exogenous myc-Rho (right panels). The expression level of each endogenous Rho protein in TNF-stimulated HUVECs was then normalized to the intensity signal from their corresponding standard lysate, so the relative abundance of RhoB and RhoC could be quantified and represented with respect to RhoA protein expression (bottom left graph). Graph represents the mean + S.E.M. from six different lysates of TNF-stimulated HUVECs.

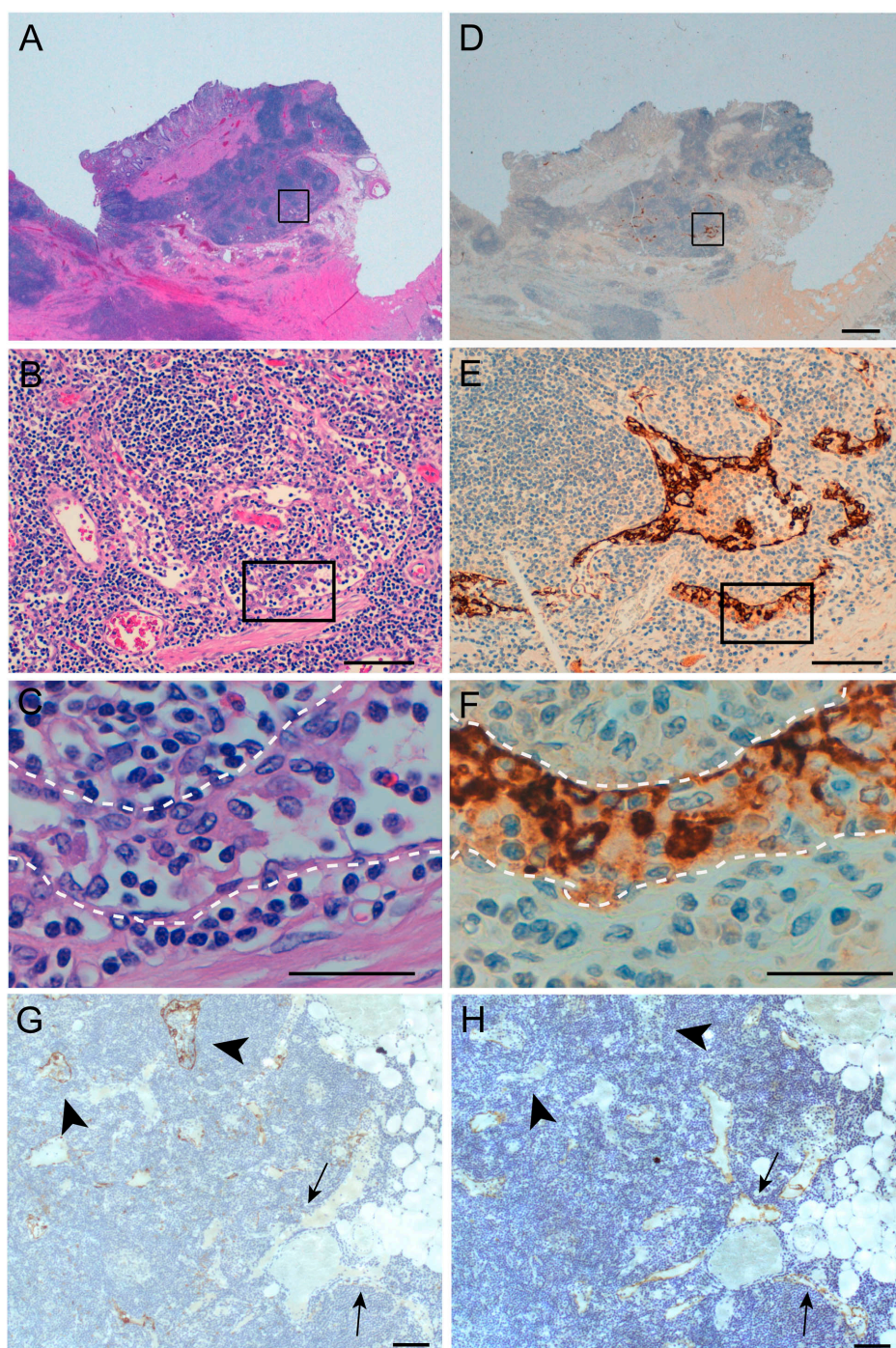


Figure S2. (A-C) Hematoxylin and eosin staining of a fissure in a small intestine from a patient with Crohn's disease. (B), enlargement of the squared area in (A). (C), enlargement of the squared area in (B). **(D-E)** Immunodetection of RhoB in a consecutive paraffin section of the same tissue area. RhoB staining corresponds to capillaries or postcapillary venules of larger size. (E), enlargement of the squared area in (D). (F), enlargement of the squared area in (E). (C,F). A small vessel marked with a discontinuous white line shows capillary hyperplasia, with RhoB-positive endothelial cells emitting protrusions into the vessel lumen. RhoB is also expressed in blood cells. **(G,H)** Consecutive paraffin sections of a ganglion from a colon adenopathy stained for RhoB (G) and the lymphatic vessel marker podoplanin (H). Note that RhoB is preferentially expressed in vessels negative for podoplanin (arrowheads), whereas RhoB expression in podoplanin-positive vessels (arrows) is weaker or negative. Scale bars, 100 μ m. Scale bars (A,D) 1 mm; (B-E) 100 μ m; (C,F) 20 μ m; (G,H) 100 μ m.

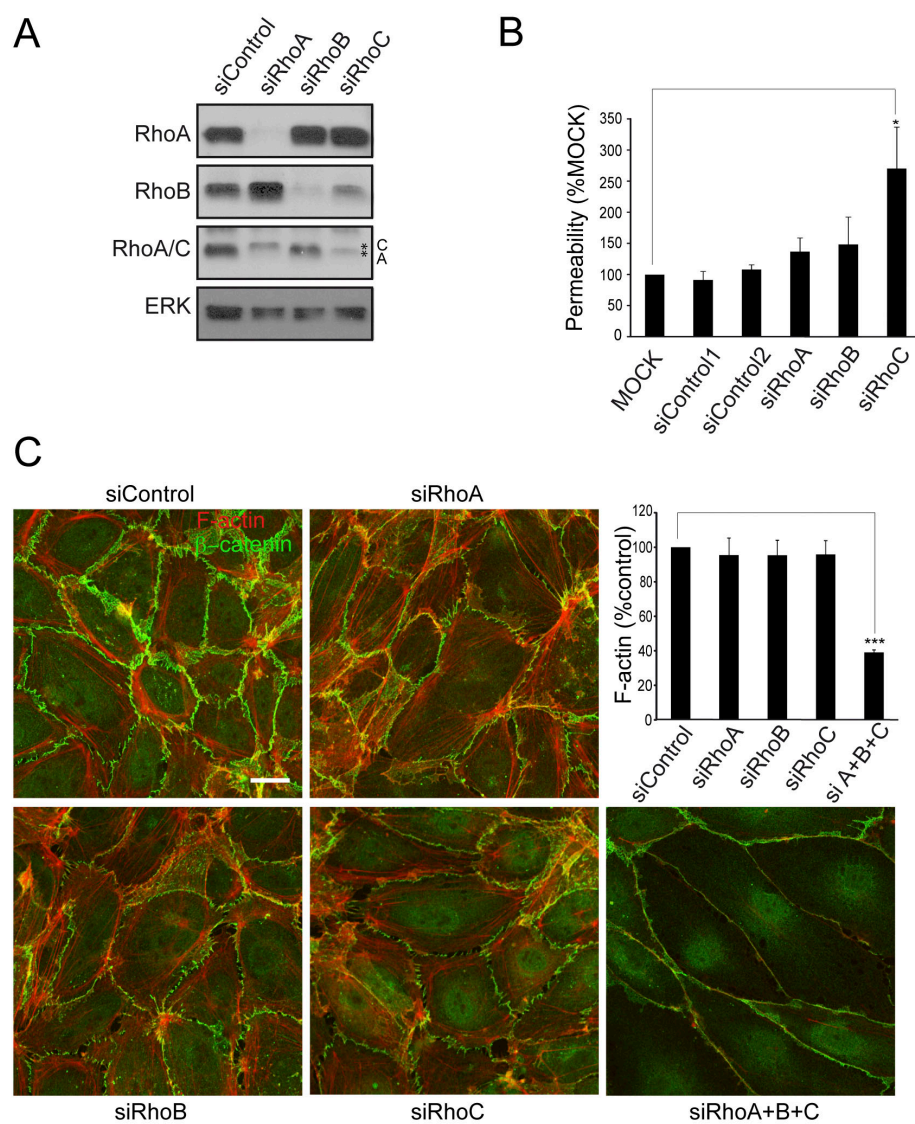


Figure S3. RhoC regulates permeability and plays a redundant role with RhoA and RhoB in regulating F-actin levels in unstimulated HUVECs. (A) HUVECs were transfected in parallel with control siRNA (siControl) or with siRNA targeting RhoA, RhoB or RhoC (siRho). siRNA RhoB corresponds to siRhoB1. 72 h after transfection, Rho levels were analyzed by immunoblotting. The relative molecular weight of RhoA is different to that of RhoC so the latter can be identified with an antibody against RhoC and RhoA (RhoA/C) (asterisks). ERK immunoblot is shown as a loading control. (B) Permeability to dextran-FITC in HUVECs previously transfected with the indicated siRNAs and plated on transwells for 48 h. Graph represents the mean + S.E.M. from three different experiments. *, p value <0.05 (C) siRNA transfected HUVECs were fixed and stained for F-actin and β -catenin. Scale bar, 20 μ m. Intensity of F-actin staining per cell was quantified in five different experiments (top right graph). Graph represents the mean + S.E.M. ***, p-value 2.19×10^{-6} .

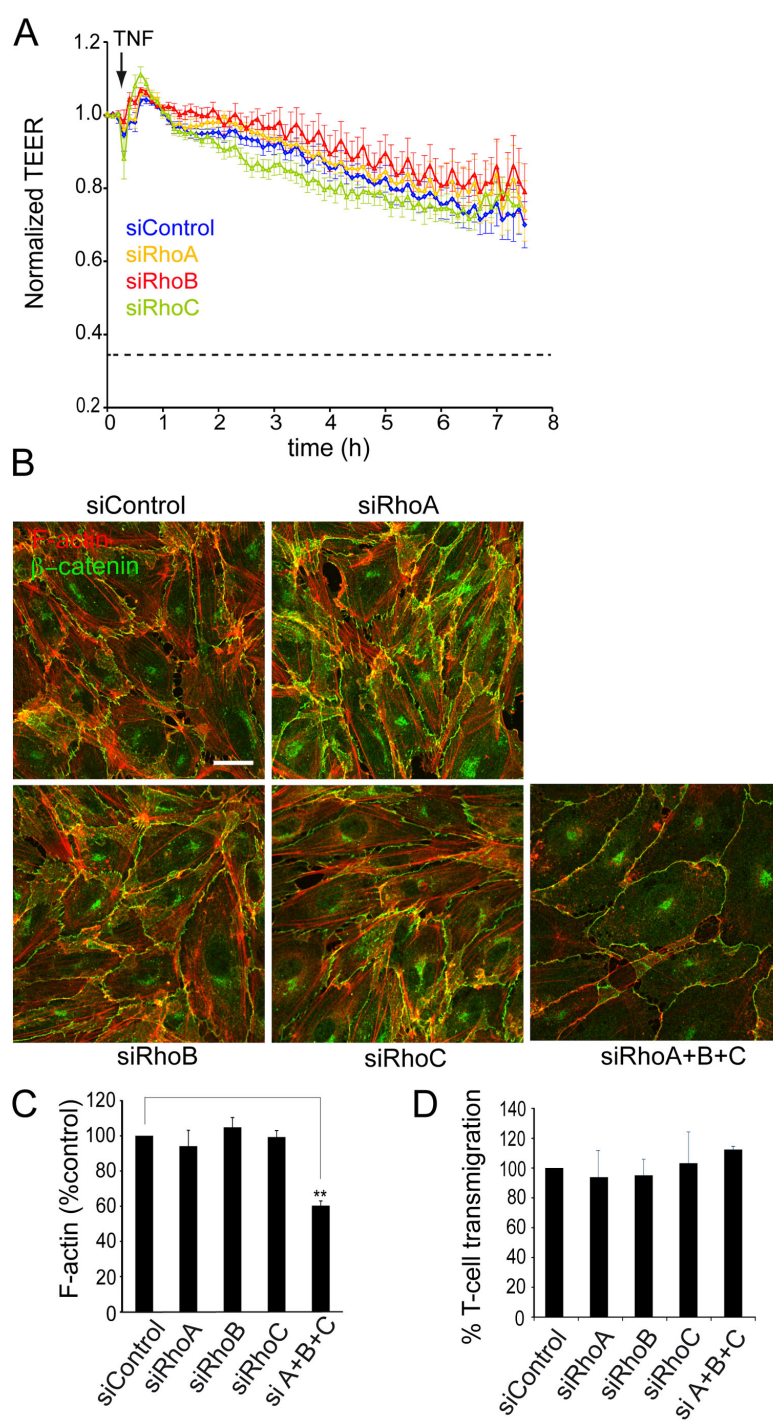


Figure S4. RhoA, RhoB and RhoC are not necessary for TNF-mediated permeability increase. (A) siRNA transfected HUVECs were stimulated with TNF and changes in TEER measured by ECIS. Discontinuous line shows TEER levels in empty wells. Graph represents the mean \pm S.E.M. from five different experiments. (B) Changes in F-actin staining intensity in siRNA transfected HUVECs stimulated with TNF for 7 h. Scale bar, 20 μ m. (C) Intensity of F-actin staining per cell was quantified in three different experiments. Graphs shows the mean + S.E.M. **, p-value= 4×10^{-4} . (D) HUVECs were transfected with the indicated siRNA oligonucleotides. 24 h post-transfection, cells were seeded on 3 μ m-pore transwells for 48 h to confluence and stimulated with TNF for 7 h. Calcein-labeled T-lymphoblasts were added to the top of the transwells. After 4 h, calcein in bottom wells was measured in a fluorescent microplate reader to detect transmigrated T-cells. Graph represents the mean + S.E.M. of three different experiments.

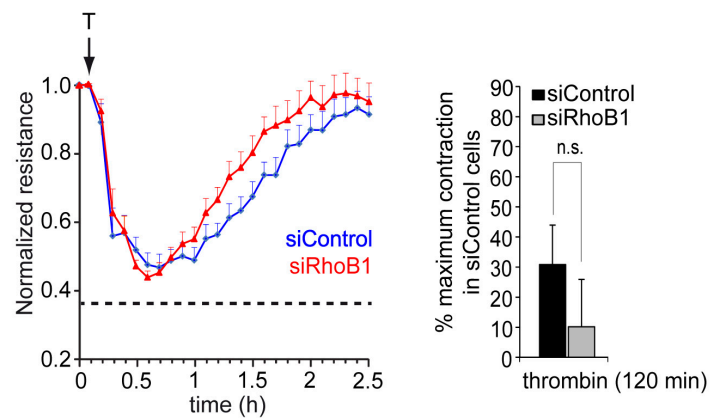
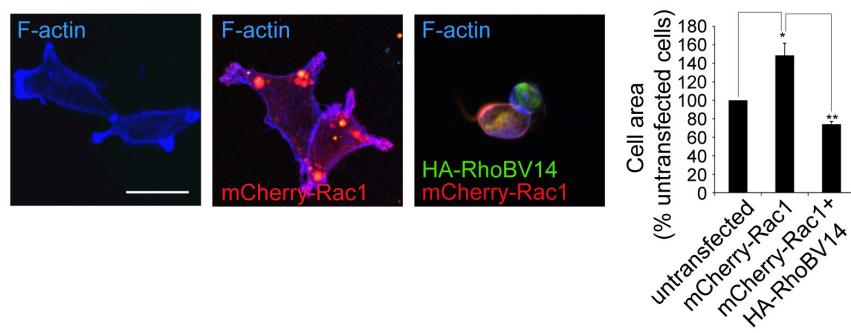
A**B**

Figure S5. (A) Effect of RhoB siRNA on barrier recovery in endothelial cells not previously stimulated with TNF. HUVECs were transfected with the indicated siRNAs, starved and the effect of thrombin stimulation (T) analyzed by ECIS. Right graph. Quantification of cell contraction. The mean \pm S.E.M. from five independent experiments is shown. **(B)** Active RhoB negatively regulates Rac1-induced membrane extensions. mCherry-Rac1 expression in HEK293 cells is sufficient to induce membrane extensions. RhoBV14 co expression prevents Rac1 membrane protrusions. Right graph quantifies cell area in at least twelve cells per condition from three different experiments and shows the mean + S.E.M. *, p-value=0.011; **, p-value=0.003. Scale bar, 20 μ m.

Table S1. Summary of RhoB expression levels detected in human tissues.

Small intestine		
Control	Crohn's disease (no fissure)	Crohn's disease (fissure)
-	-	+
-	-	+
-	-	+/-
-	-	-
Large intestine		
Control	Crohn's disease (no fissure)	Crohn's disease (fissure)
-	-	+
-	-	+/-
-	-	+/-
-	-	-
Liver		
Control	HBV infection	Allograft rejection
-	+	+
+	+	
+		
Ganglion from colon adenopathies		
Blood vessels	Lymphatic vessels	
+	-	
+	-	

